

# **Anticorpos anti-interleucina 6 e 1 em doentes com pneumonia com empiema pleural**

**Fábio Daniel Simões Gomes**

Dissertação para obtenção do  
**Grau de Mestre em Microbiologia Médica**

**Outubro de 2019**





UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**NOVA**

INSTITUTO  
NACIONAL  
DE DOENÇAS  
INFECCIOSAS  
E DE ALERGIA

**itqb**

UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**4nfc**  
ANOS  
FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

# **Anticorpos anti-interleucina 1 e 6 em doentes com pneumonia com empiema pleural**

**Fábio Daniel Simões Gomes**

Dissertação para obtenção do  
**Grau de Mestre em Microbiologia Médica**

Orientadores:  
Catarina Martins FCM|NMS  
Luís Miguel Borrego FCM|NMS

Nova Medical School|Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa  
(NMS|FCM-UNL)  
Laboratório de Imunodeficiências Primárias

**Outubro de 2019**



## Agradecimentos

Várias pessoas contribuíram, diretamente ou indirectamente, para a realização desta dissertação e que sem dúvida foram fundamentais ao longo deste percurso e das quais fico inteiramente agradecido.

Primeiramente gostaria de agradecer à Doutora Catarina Martins, como minha orientadora, pela maneira como recebeu no laboratório de imunologia, pela simpatia e sobretudo pelo esforço, disponibilidade, dedicação, e atenção que me deu ao longo deste período, e que me ajudou bastante a cumprir os meus objetivos e a finalizar esta etapa tão importante para mim. Um enorme obrigado.

Ao Doutor Luís Miguel Borrego pela oportunidade que me deu de realizar o trabalho no laboratório de Imunologia e pela sua inteira disponibilidade e simpatia ao longo deste percurso.

Ao Dr. João Farela Neves e ao Dr. Gonçalo Padeira pela ajuda fundamental na parte da clinica hospitalar e pela construção do vínculo comunicativo entre o Hospital Dona Estefânia e a Faculdade que facilitou bastante a elaboração desta dissertação.

A todo o pessoal do laboratório de imunologia, à Gloria, à Teresa e à Filomena, por estarem sempre disponíveis para ajudar no que fosse preciso. Um obrigado especial também ao Miguel Dias, pelas boas gargalhadas que demos e pela sua ajuda ao longo desta dissertação que fez com que os dias no laboratório não se tornassem monótonos.

Aos meus antigos colegas de Faculdade, Fernando Morais e Joana Rosa, que apesar de estarmos separados pela distância, sempre nos mantivemos em contacto o que foi fundamental para não esmorecer nos dias mais difíceis. Obrigado grupo maravilha.

Aos meus pais, Opílio Simões e Maria de Fátima Gomes, pelo enorme esforço que sempre fizeram para que um dia chegasse até aqui, e à confiança que sempre depositaram em mim. Estão de parabéns.

Por último mas não menos importante, à minha avó (*in memoriam*) que sempre expressou a vontade de ver o seu neto a cumprir um percurso académico e que infelizmente não conseguiu presenciar este momento. Esteja onde estiver, certamente estará muito orgulhosa.



## Resumo

Inicialmente relatados apenas em doentes com patologias inflamatórias crónicas, anticorpos anti-citocinas inflamatórias (AACi) existem em indivíduos saudáveis. O seu significado não está definitivamente estabelecido, podendo ser protetores ou neutralizadores das citocinas que reconhecem.

A pneumonia é um evento infeccioso frequente na população pediátrica, porém o quadro de desenvolvimento de empiema subsequente não está bem esclarecido. Considerando esta complicação como sinal de resposta inflamatória inadequada, pode considerar-se nestes quadros a presença de AACi, em particular anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ , já que são elementos-chave da resposta inflamatória. Assim, propusémo-nos estudar estes AACi em doentes com pneumonia com empiema (PCE) e sem empiema (PSE), em doentes com Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), como condição de doença autoimune, e controlos saudáveis.

Não se verificaram diferenças na generalidade dos dados demográficos e parâmetros inflamatórios avaliados. Todavia, as crianças PCE mostraram ser tendencialmente mais jovens, e com parâmetros inflamatórios mais elevados. A IL-6 mostrou-se a citocina mais abundante, sobretudo presente nos doentes com pneumonia, e a IL-1 $\beta$  foi praticamente indetetável no grupo PCE, sendo sobretudo frequente no grupo DMT1, apontando para diferentes perfis inflamatórios em doentes com background autoimune ou com inflamação associada a infeção bacteriana.

A presença de autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$  foi residual, mas os anti-IL-6 mostraram-se bastante prevalentes, verificando-se que no grupo PCE a sua presença era menor. Curiosamente, doentes com pneumonia seropositivos para anticorpos anti-IL-6 mostraram razão Neutrófilos/Linfócitos aumentada, um elemento a favor da ação dos autoanticorpos na resposta da citocina. A concentração de autoanticorpos pode ser também relevante, como sugere a observação do doente com maior título de anti-IL-6 ter a menor contagem de leucócitos.

Este estudo reforça a necessidade de aprofundar esta temática em coortes de maior dimensão, desenvolvendo ensaios que permitam esclarecer de que forma as citocinas são reguladas pelos respetivos autoanticorpos, caracterizando-os qualitativa e quantitativamente, por exemplo em plataformas multiplex, que carecem ainda de maior robustez analítica.





## Abstract

Initially only mentioned in patients with chronic inflammatory pathologies, antibodies anti-inflammatory cytokines (AACi) have been reported in healthy subjects. Their role is not clear, being able to have both protective or neutralizing functions in the cytokines they recognize.

Pneumonia is an infectious event frequent in paediatric patients, however, the development of subsequent empyema is not well understood. Considering this complication as a sign of inadequate inflammatory responses, we may consider the presence of AACi, in particular anti-IL-6 and anti-IL-1 $\beta$ , as these cytokines are crucial in inflammatory responses. Thus, we aimed to study these AACi in patients with pneumonia with empyema (PCE) and without empyema (PSE), in patients with Diabetes Mellitus type 1 (DMT1) as a condition of autoimmune disease, and healthy controls.

There were no differences in general demographic and inflammatory parameters. However, children with PCE were younger and presented with higher inflammatory parameters. IL-6 was the most abundant cytokine, especially in patients with pneumonia, and IL-1 $\beta$  was almost undetectable in the PCE group, being particularly frequent in the DMT1 group, showing different inflammatory profiles in patients with autoimmune background or with infection-associated inflammation.

The presence of autoantibodies anti-IL-1 $\beta$  was residual, but the anti-IL-6 antibodies proved to be more prevalent, though lower prevalence was observed in the PCE group. Interestingly, pneumonia patients positive for anti-IL-6 antibodies presented increased Neutrophil / Lymphocyte ratios, which may show the effect of autoantibodies on cytokine responses. Autoantibody concentration may also be relevant, as suggested by the observation of the patient with the highest anti-IL-6 titer which had the lowest leukocyte count.

This study reinforces the need to deepen this theme in larger cohorts, developing tests that allow to clarify how cytokines are regulated by their autoantibodies, characterizing them qualitatively and quantitatively, like for example in multiplex platforms, which still lack analytical robustness.



## **Palavras-chave**

Autoanticorpos; Interleucina-1 $\beta$ ; Interleucina-6; Pneumonia; Empiema



## Índice

<b>Índice de figuras.....</b>	<b><i>xi</i></b>
<b>Índice de tabelas.....</b>	<b><i>xii</i></b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 A Resposta Imune – Inflamação e Resposta Inata.....	1
1.2 A Resposta Imune – Os Linfócitos T.....	3
1.3 A Resposta Imune – Os Linfócitos B .....	5
1.4 A Resposta Imune – Apresentação de antígenos e a Resposta Adaptativa.....	9
1.5 A Resposta Imune – Citocinas .....	11
1.6 Interleucina 1.....	12
1.7 Interleucina 6.....	14
1.8 Autoimunidade e o desenvolvimento de anticorpos anti-interleucinas .....	15
1.9 Anticorpos anti-Interleucina 1 .....	20
1.10 Anticorpos anti-Interleucina 6 .....	22
1.11 Pneumonia e Empiema pleural .....	23
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Material e métodos .....</b>	<b>31</b>
3.1 População do estudo e recrutamento .....	31
3.2 Desenho do estudo .....	31
3.3 Detecção de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ por ensaios imunoenzimáticos clássicos .....	33
3.4 Citometria de Fluxo.....	34
3.5 Doseamento de Interleucina 6 e 1 $\beta$ Imunoensaio multiplex CBA .....	35
3.5.1 Preparação dos <i>Standards</i> .....	36
3.5.2 Preparação das esferas de captura .....	36
3.5.3 Preparação do reagente de deteção.....	36
3.5.4 Protocolo de ensaio .....	37
3.5.5 Estratégia de aquisição e análise .....	38
3.6 Detecção de autoanticorpos por imunoensaio de CBA .....	39
3.6.1 Preparação dos <i>Standards</i> .....	39
3.6.2 Preparação das esferas .....	39
3.6.3 Preparação do reagente de deteção.....	40
3.6.4 Protocolo de ensaio .....	40
3.6.5 Estratégia de aquisição e análise .....	41
3.7 Equipamentos e software.....	42

3.8	Estatística .....	42
4	<i>Resultados e Discussão</i> .....	45
4.1	População do estudo.....	45
4.2	Avaliações laboratoriais de rotina – parâmetros inflamatórios .....	50
4.3	Perfil citocínico .....	54
4.4	Autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ .....	58
4.5	Autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ – avaliação de métodos de ensaio .....	65
4.6	Imunoensaio CBA para detecção de autoanticorpos .....	69
5	<i>Conclusões</i> .....	75
6	<i>Perspetivas Futuras</i> .....	77
7	<i>Referências Bibliográficas</i> .....	79

## Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática da maturação da linhagem das células T no Timo.....	4
Figura 2 - Esquema dos estadios de desenvolvimento de uma célula B.....	7
Figura 3 - Diferenciação da linhagem de células T CD4 auxiliaadoras: Funções, fatores de transcrição e citocinas características.....	10
Figura 4 - Associação entre a presença de diversos autoanticorpos anti citocinase diferentes manifestações de doença.....	17
Figura 5 - Esquema representativo dos mecanismos de efusão pleural desenvolvidos durante uma pneumonia bacteriana.....	25
Figura 6 - Estratégia de análise para avaliação quantitativa de citocinas.....	38
Figura 7 - Esquema representativo do ensaio multiplex CBA para detecção de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ .....	39
Figura 8 - Estratégia de análise para avaliação semiquantitativa de FITC e PE presente no ensaio Multiplex CBA para detecção de autoanticorpos anti-IL-6 (espectro A7) e anti-IL-1 $\beta$ (Espectro B4).....	41
Figura 9 - Representação de uma tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade.....	43
Figura 10 - Representação esquemática do número de indivíduos (n) por amostra das várias populações incluídas no estudo .....	45
Figura 11 - Comparação dos parâmetros inflamatórios nos grupos PSE e PCE.....	52
Figura 12- Doseamento de Interleucinas-6 e Interleucinas-1 $\beta$ utilizando a técnica de CBA.....	55
Figura 13 - Comparação entre amostras da presença de autoanticorpos anti-IL-6 e autoanticorpos anti IL-1 $\beta$ .....	62
Figura 14 - Verificação da linearidade para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ .....	66
Figura 15 - Verificação da linearidade para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ com recurso a regressão logística 4PL.....	67
Figura 16 – Comparação da fluorescência do anticorpo secundário (PE- Ficoeritrina) nas amostras com Top Standard de IL-6 e IL-1 $\beta$ .....	70
Figura 17 – Comparação da fluorescência do anticorpo secundário anti-IgG humana (FITC- Isotiocinato de Fluoresceína) nas amostras com Top Standard de IL-6 e IL-1 $\beta$ .....	71





## Índice de tabelas

Tabela I – Caracterização clínica e demográfica dos grupos das crianças recrutadas.....	46
Tabela II – Parâmetros inflamatórios dos grupos PSE e PCE na admissão hospitalar.....	50
Tabela III – Citocinas inflamatórias avaliadas nos grupos PSE, PCE, DMT1 e Controlos Saudáveis.....	54
Tabela IV – Avaliação qualitativa dos níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$ entre os grupos em estudo.....	56
Tabela V – Avaliação da presença de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ em PSE, PCE, DMT1 e CS.....	59
Tabela VI – Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais em doentes com pneumonia com e sem anticorpos anti-IL-6.....	61
Tabela VII – Avaliação da frequência de títulos elevados de anticorpos anti-IL-6, em função da sua presença em controlos saudáveis.....	64
Tabela VIII – Avaliação da precisão dos kits de imunoensaio enzimático usados na pesquisa de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ .....	68
Tabela IX – Avaliação de sensibilidade e especificidade para o ensaio CBA modificado para anticorpos anti-IL-6, usando como valor de <i>cut-off</i> de positividade, a MFI do percentil 75 dos controlos saudáveis....	72
Tabela X – Avaliação de sensibilidade e especificidade para o ensaio CBA modificado para anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , usando como valor de <i>cut-off</i> de positividade, a MFI do percentil 75 dos controlos saudáveis....	73



## Lista de abreviaturas

4PL – Regressão logística de 4 parâmetros / 4-Parameter Logistic regression

AA – Autoanticorpos

AACi – Autoanticorpos anti citocinas inflamatórias

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AIRE – Regulador autoimune

APC – Células apresentadoras de antígeno

APS1/APECED – Síndrome poliglandular autoimune tipo 1/ Poliendocrinopatia autoimune candidíase-distrofia ectodérmica

AR – Artrite reumatoide

ARN – Ácido ribonucleico

BAFF – fator ativador da célula B

BCR – Recetor de célula B

CBA – *Cytometric Bead Array*

CCR7 – receptores de quimiocina CC tipo 7

CD – *Cluster* de diferenciação

CD40L – CD40 ligando

chILD – Doença pulmonar intersticial infantil

CS – Controlos saudáveis

CXCR5 – Recetor de quimiocina CXC tipo 5

DC – Célula Dendrítica

DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DN – Células T Duplas negativas

DO – Densidade Ótica

DP – Células T Duplas positivas

DPI – Doença pneumocócica invasiva

DTC – Doença do Tecido Conjuntivo

FcεRI – Recetor de IgE de alta afinidade

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

G-CSF – Fator estimulador de Colónias de Granulócitos

GM-CSF – Fator estimulador estimulador de colonias de granulócitos-macrófagos

Gp130 – Glicoproteína 130

HDE-CHLC – Hospital Dona Estefânia-Centro Hospitalar de Lisboa Central

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

HRP – Peroxidase de rábano / Horseradish Peroxidase

ID – Imunodeficiências

IDP – Imunodeficiências primárias

IFN – Interferão

Ig –Imunoglobulina

IL – Interleucina

IL1-R – Recetor da Interleucina-1

IL-6R – Recetor da Interleucina-6

LPS – Lipopolissacarídeos

MFI – Intensidade média de Fluorescência

MHC I – Complexo Major de Histocompatibilidade classe I

MHC II – Complexo Major de Histocompatibilidade classe II

NK – *Natural Killer*

PAC – Pneumonia adquirida na comunidade

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PCE – Pneumonia com empiema

PCR – Proteína C Reativa

PE – Ficoeritrina

PGE2 – Prostaglandina-E2

PRRs – Recetores de reconhecimento de padrões

PSE – Pneumonia sem empiema

ROC – Curva Característica de Operação do Receptor

SIGIRR – Recetor único de Ig da Interleucina 1

sIL-6R – Recetor solúvel da interleucina-6

TCR – Recetor de célula T

TD - Timo dependente

Tfh – Linfócitos T helper foliculares

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento tumoral  $\beta$

Th – Células T auxiliaadoras

TI – Timo independente

TIGGIR-1 – Três dominios da Ig contendo o recetor tipo 1 da Interleucina 1

TIGGIR-2 – Três dominios da Ig contendo o recetor tipo 2 da Interleucina 1

TLR – Recetores *Toll Like*

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – Factor de Necrose Tumoral

Treg – Células T reguladoras



## 1 Introdução

A resposta imune está intrinsecamente ligada à interação do hospedeiro com diversos microrganismos. A ativação desta resposta pode ocorrer quando há entrada de agentes patogênicos no organismo, tais como vírus, bactérias e outros parasitas, bem como das suas macromoléculas, que são reconhecidas como agentes estranhos. A resposta imune funciona assim protegendo os indivíduos de uma infecção, reconhecendo e eliminando elementos estranhos que podem causar danos nos tecidos e órgãos, levando ao desenvolvimento de várias doenças. Contudo, neste processo de resposta é essencial diferenciar o próprio do não-próprio. A tolerância imunológica compreende assim um conjunto de mecanismos no hospedeiro que impedem respostas imunes autorreativas patológicas. Quando a tolerância imunológica ao próprio é perdida, o organismo desenvolve uma resposta agressiva contra os próprios tecidos e células, com o potencial surgimento de uma doença autoimune.

O sistema imune reúne vários tipos de células e mediadores, presentes em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo, que interagem entre si segundo dois pilares principais: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Ambos os mecanismos de resposta estão interligados, mas assumem tarefas diferentes. Na resposta inata predominam células como os granulócitos e macrófagos, sendo esta resposta imediata, mas limitada, não específica, sem memória, e intrinsecamente presente no indivíduo. Por outro lado, na resposta adaptativa, as células efetoras são sobretudo os Linfócitos T e os Linfócitos B. A resposta adaptativa surge após exposição a um antígeno estranho, atuando de forma específica, com geração de memória imunológica. Contudo, esta é uma resposta que se estabelece de forma mais lenta, uma vez que precisa de promover a diferenciação das suas células efetoras, mas que por isso mesmo matura ao longo do tempo, após um ou continuados contactos com o antígeno agressor.

### 1.1 A Resposta Imune – Inflamação e Resposta Inata

Na sua génese, uma resposta imune estabelecida no contexto de uma infecção ocorre quando existe a quebra das barreiras anatómicas físicas, químicas e/ou microbiológicas do organismo. Estas barreiras possuem um papel fundamental na defesa do organismo, prevenindo a entrada de antígenos estranhos, já que a sua entrada e reconhecimento levam a que se gere uma subsequente resposta inflamatória (Murphy *et al.*, 2017).

Reconhecida já pelo romano Celsus no primeiro século D.C., a resposta inflamatória caracteriza-se por cinco elementos básicos: *rubor*, *calor*, *tumor*, *dolor* e *functio laesa*. É mediada por uma série de eventos que envolvem mediadores químicos, muitos dos quais com origem nas várias células envolvidas nas respostas inatas, que assumem funções como a fagocitose.

Assim, após a entrada dos microrganismos, a ativação dos endotélios da zona afetada permite um elevado fluxo de neutrófilos que migram para o local de infecção, e também de monócitos que rapidamente se poderão diferenciar em macrófagos e outras células fagocíticas, com o objetivo de fagocitar e eliminar os agentes patogénicos presentes. Neste contexto, há o reconhecimento de padrões moleculares associados aos microrganismos por recetores de padrões presentes na superfície dos fagócitos - os Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Para além dos padrões moleculares associados a agentes patogénicos (Padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs), estes recetores podem detetar também padrões associados a lesões no tecido (*Danger-associated molecular patterns* - DAMPs). Existem vários tipos de PRRs, alguns com capacidade de mediar a fagocitose, mas também de sinalizar o reconhecimento de padrões para a célula, como é o caso dos *Toll-like receptors* (TLR). Estes recetores transmembranares estão divididos em várias famílias, tendo sido identificados mais de dez recetores diferentes em humanos. Cada TLR reconhece uma estrutura distinta: por exemplo os TLR1/TLR6/TLR10 atuam em associação com o TLR2 e reconhecem lipomanano presente em micobactérias, ácidos lipoteicóicos presentes em bactérias Gram negativas e lipopéptidos bacterianos diacilados e triacilados. Ainda nas superfícies celulares, encontra-se o TLR4, que em ligação com o CD14, reconhece Lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram negativas, e as estruturas de flagelina presentes nas bactérias Gram negativas são reconhecidas pelo TLR5, também nas membranas citoplasmáticas. Por seu lado, ao nível das membranas de compartimentos celulares como as vesículas endocíticas, encontramos o TLR3, que reconhece ácido ribonucleico (ARN) de cadeia dupla presente em alguns vírus, ou os TLR7/TLR8, que reconhecem RNA de cadeia simples também de origem viral. Entre os TLRs mais estudados ao nível dos compartimentos celulares, está também o TLR9, capaz de reconhecer locais com dinucleotídeos CpG não metilados presentes no ácido desoxirribonucleico (ADN) das bactérias (Jiménez-Dalmaroni, & Adamopoulos, 2016).

O reconhecimento dos PAMPs por recetores da resposta inata, como os TLR, faz com que a célula aumente a transcrição dos genes envolvidos na resposta inflamatória, levando à produção de citocinas como a IL-1 $\beta$  e a IL-6. Estas citocinas atuam a nível local, promovendo o aumento do fluxo sanguíneo e o recrutamento de células para as áreas afetadas, mas também possuem efeitos sistémicos, como o aumento da temperatura corporal ou o aumento da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Encontramos entre estas proteínas de fase aguda a PCR (Proteína C Reativa), proteínas amiloides séricas, fosfolipase secretora A2 e proteínas de ligação de manose. Entre as suas funções, as proteínas de fase aguda facilitam a ativação do sistema do complemento, mas também a opsonização de bactérias facilitando a fagocitose (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

## 1.2 A Resposta Imune – Os Linfócitos T

Alguns tempos após o desenvolvimento da resposta inata, começa a desenrolar-se a resposta adaptativa. Esta é mediada pelos Linfócitos B, que assumem a resposta humoral, e pelos Linfócitos T, que assumem a chamada resposta celular.

Os precursores dos Linfócitos diferenciam-se na medula óssea, sendo que as células da linhagem B terminam a sua maturação na medula óssea, enquanto as células da linhagem T migram para o Timo, onde se efetua o seu desenvolvimento maturativo.

O timo é um órgão linfóide primário, onde as células progenitoras linfóides que migraram da medula óssea iniciam o seu processo de maturação neste microambiente propício para se formar um repertório funcional de células T. Após a sua entrada neste órgão linfóide, o progenitor linfóide irá iniciar um processo altamente programado, orientado pelas células do Timo, enquanto migra entre o córtex e a medula tímica (Figura 1). Quando as células progenitoras colonizam o Timo, podem diferenciar-se como células NK (Natural Killer) ou comprometerem-se com a linhagem T.

No timo, as células T imaturas começam a proliferar e a sofrer mudanças fenotípicas na sua superfície. Estas células progenitoras da linhagem T mais imaturas são consideradas Dupla Negativas (DN) pois não possuem marcadores CD4 ou CD8 ( $CD4^-/CD8^-$ ). No entanto, apesar destes coreceptores não serem expressos nos estádios mais precoces, existe a expressão de outras moléculas de superfície e podem ser divididas em subpopulações: DN1 ( $CD34^+/CD38^-/CD1a^-$ ), DN2 ( $CD34^+/CD38^+/CD1a^-$ ), DN3 ( $CD34^-/CD38^+/CD1a^+$ ). O início dos rearranjos genéticos ocorre na cadeia  $\beta$  do TCR entre as fases DN2 e DN3, e é também nestes estádios que se inicia o rearranjo das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ , que podem levar ao desenvolvimento de células da linhagem T  $\gamma\delta$ . Estas células T  $\gamma\delta$  são células T não convencionais que reconhecem antígenos não proteicos e possuem funções efetoras distintas como a produção de citocinas, a indução da morte de células infetadas através de granzimas, granzimas e perforinas, entre outras moléculas presentes nos seus grânulos (Bonneville, O'Brien, & Born, 2010).

Se os rearranjos genéticos dos genes das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  não for funcional, então irá continuar-se o rearranjo das cadeias  $\beta$ , que, caso dê origem a uma proteína estável, permite que esta cadeia seja emparelhada com pseudo cadeias  $\alpha$ , num recetor conhecido como pré-TCR. A sinalização do pré-TCR promove um mecanismo de feedback positivo, que leva a célula a entrar em proliferação e a iniciar o rearranjo dos genes das cadeias  $\alpha$ . Também como resultado da sinalização do pré-TCR, inicia-se a expressão dos coreceptores CD4 e CD8, passando as células a entrar num novo estádio de desenvolvimento, chamado células Duplas Positivas (DP) com co-expressão de CD4 e CD8. O rearranjo das cadeias  $\alpha$ , caso seja funcional, permitirá que a célula passe a poder expressar por fim um TCR à sua superfície (Staal, Wiekmeijer, Brugman, & Pike-Overzet, 2016). É a partir desta fase que as células irão sofrer vários processos de seleção, ou seja, a seleção da linhagem, para que possam assumir-se como células T CD4 ou células T CD8, mas também processos Seleção Positiva e Seleção Negativa que irão garantir um repertório efetivo e não autorreativo.



No córtex tímico, a seleção positiva testa a funcionalidade dos heterodímeros do recetor da célula T expressos na superfície celular dos timócitos Duplos Positivos: se permitirem a ligação do timócito a um complexo péptido-MHC com um limiar mínimo de afinidade, estes timócitos recebem um sinal de sobrevivência. A seleção negativa, por sua vez, ocorre na medula tímica logo a seguir à Seleção Positiva. Neste caso, os timócitos cujo TCR possua alta afinidade para o complexo péptido-MHC sofrem apoptose (Metzger, & Anderson, 2011). O gene *AIRE* (regulador autoimune) é um elemento crucial para a seleção negativa dos timócitos. Este fator de transcrição é expresso pelas células medulares epiteliais do Timo. A sua ativação nas células tímicas induz a expressão de vários antígenos específicos dos tecidos do próprio indivíduo, tipicamente expressos na periferia. Esta expressão de antígenos tecidulares no Timo permite a seleção negativa dos Linfócitos autorreativos, ou seja, se os timócitos tiverem alta afinidade para os autoantígenos presentes no timo, são eliminados por apoptose, prevenindo a sua libertação para a periferia onde teriam potencial para dar origem a várias doenças autoimunes (Conteduca, Indiveri, Filaci, & Negrini, 2018).

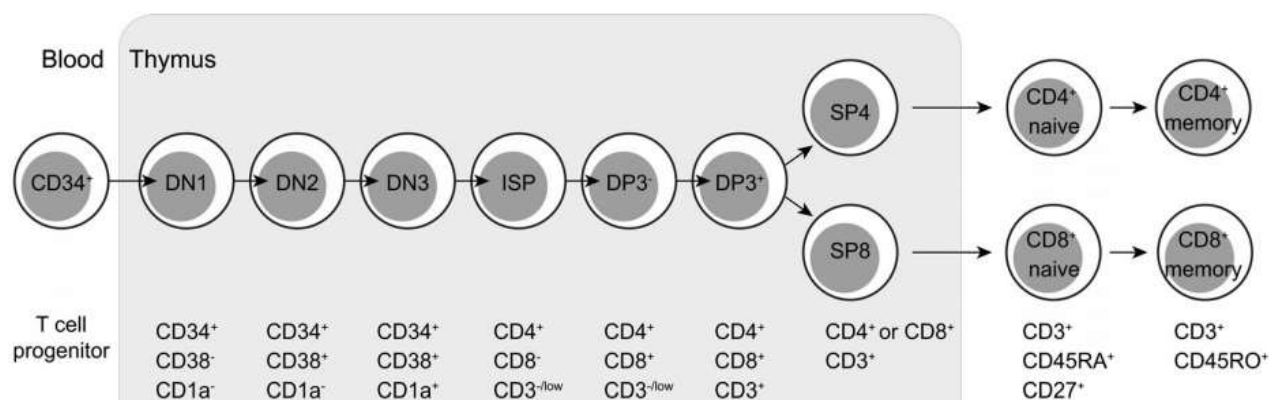


Figura 1 – Representação esquemática da maturação da linhagem das células T no Timo. Adaptado de Staal F., *et al.*, (2016).

A especificidade do TCR para o péptido apresentado pelo MHC, na seleção positiva, irá ser importante também na escolha da linhagem CD4 ou CD8. Ou seja, se o TCR expresso na célula interagir com o antígeno apresentado por moléculas de MHC de classe I (*Major Histocompatibility Complex Class I*), a célula T irá maturar continuando a expressão do coreceptor CD8; se o recetor da célula T interagir com o antígeno apresentado por moléculas de MHC de classe II (*Major Histocompatibility Complex Class II*), a célula irá expressar o coreceptor CD4 (Boehmer *et al.*, 1989). Assim, estas células assumem o estadio final de maturação, tornando-se unicamente positivos para CD8 ou unicamente positivos para CD4 (*Single Positive – SP*), migrando depois para os órgãos linfóides secundários.

Funcionalmente, as células T podem ser denominadas de células T auxiliaadoras ou *helper* (Th), se expressarem CD4, e células T citotóxicas, se expressarem CD8. O reconhecimento do antígeno pelo recetor da célula T é diferente para estas células: os Linfócitos T CD8 reconhecem apenas o antígeno apresentado em moléculas de MHC de classe I, e as células T CD4 em moléculas de MHC de classe II. Como as células T CD4 e as células T CD8 têm funções diferentes, a molécula de MHC usada para apresentar um antígeno determinará também o tipo de resposta gerada: as células T citotóxicas CD8 são ativadas pelos antígenos apresentados pelas moléculas do MHC classe I que estão presentes em todas as células nucleadas. Assim, qualquer célula infetada por um vírus ou outro patógeno intracelular, ou qualquer célula que esteja a produzir antígenos tumorais, pode apresentá-los, de modo a que posteriormente possam sofrer um ataque citotóxico (Berg & Forman, 2006). Por sua vez as células T CD4 podem ser ativadas e seguirem uma diferenciação dependente das citocinas produzidas. Aquando da ligação do MHC de classe II das APC com o TCR da célula T naïve, irão ser ativadas várias vias de sinalização que eventualmente conduzem à proliferação e diferenciação destas células T em células T efetoras. Os perfis de diferenciação assumidos tipicamente são designados por Th1, Th2, Th17, ou Treg, entre outras coisas em função dos fatores de transcrição e das citocinas produzidas por cada subpopulação celular. Assim, cada perfil celular poderá desempenhar papéis distintos na resposta imunológica, desde a ativação da resposta imune inata, à interação com Linfócitos B ou células T citotóxicas, ou mesmo atuando como mecanismo de supressão da resposta imune (Zhu & Paul, 2008).

### **1.3 A Resposta Imune – Os Linfócitos B**

Uma das funções principais das células B é a produção de anticorpos. Os anticorpos ou imunoglobulinas têm funções importantes tais como a neutralização de toxinas, a opsonização de bactérias para posterior fagocitose, mas também contribuem para impedir que os microrganismos adiram às superfícies das mucosas, ou para ativar o sistema do complemento. Os anticorpos promovem também ataques citotóxicos a células tumorais ou infetadas (ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos) ao ligarem-se a estas células, que expressam antígenos diferentes dos habitualmente presentes em células do *self*.

Estruturalmente, as imunoglobulinas possuem duas cadeias pesadas (P) idênticas, cada uma com uma região constante, que irá mediar a função da imunoglobulina, e uma região variável, envolvida na ligação ao antígeno; e duas cadeias leves (L), também com uma região constante e uma região variável. É a conjugação das regiões variáveis das cadeias leves e das cadeias pesadas que forma o local de ligação do anticorpo ao antígeno.

Do ponto de vista do desenvolvimento e maturação, as células B efetuam a sua maturação na medula óssea, também um órgão linfóide primário, onde os precursores linfóides comuns interagem com as células medulares iniciando um processo de diferenciação típico da linhagem B.

Um dos objetivos primordiais dos processos de maturação B é a formação de um BCR efetivo na superfície destas células. Para que isto aconteça, desenvolvem-se processos de recombinação genética, em primeiro lugar nos genes das cadeias pesadas, com o rearranjo dos segmentos D (Diversidade) e J (Junção), e depois com o rearranjo dos segmentos V (variabilidade). Um rearranjo VDJ vai permitir, juntamente com a leitura dos segmentos da porção constante, formar um Pré-BCR. Ou seja, a recombinação bem-sucedida da cadeia pesada VPDJP com a região constante  $\mu$  (VDJ-C $\mu$ ), permite que se expresse uma cadeia pesada, à qual se juntam cadeias leves substitutas compostas por duas proteínas, VpreB e  $\lambda 5$ . A sinalização enviada pelo pré-BCR, resultante provavelmente da interação entre as cadeias substitutas de pré-BCRs vizinhos, vai marcar a transição entre os estádios de células Pró e Pré-B.

Após a sinalização do pré-BCR, a célula Pré-B irá proliferar, e acontecerá agora, também na medula óssea, o início do rearranjo das cadeias leves, kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), apenas com os segmentos VL e JL. A sua recombinação irá permitir a formação das cadeias leves, iniciando-se normalmente com o rearranjo dos genes k. Esta recombinação funcional, ou de cadeias k ou de cadeias  $\lambda$ , irá permitir completar a formação de uma IgM de superfície, num estadio de desenvolvimento agora reconhecido como célula B imatura. Antes de abandonar a medula, esta célula começa a realizar mecanismos de *splicing* alternativo, que conduz à formação de IgM e IgD de superfície, em simultâneo. Ainda que a IgD possa ser expressa nesta fase os seus níveis de expressão são muito baixos (Pieper, Grimbacher, & Eibel, 2013).

Há ainda a registar que, tal como as células T, também as células B têm de ser submetidas a processos de seleção de repertório. Neste contexto, ocorrem sobretudo processos de seleção negativa nas células imaturas, onde a célula que possui um BCR que reage com antígenos do indivíduo ou antígenos muito abundantes na medula óssea, ou até no baço, é eliminada, evitando assim a autorreatividade destas células na periferia caso venham a terminar a sua maturação e sobrevivam. (Dunn-Walters, 2015).

Como mecanismos de sinalização associados ao BCR, as células B possuem proteínas de sinalização, conhecidas como Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  (CD79a e CD79b, respetivamente), presentes na superfície da célula, junto ao BCR, e que assumem funções importantes no contínuo desenvolvimento do BCR (Figura 2).

A célula imatura que passar a seleção negativa deixa a medula e migra para a periferia num estadio que pode ser conhecido como célula B de transição. Estas células podem ser divididas em células de transição 1 (T1) e células de transição 2 (T2), que expressam níveis elevados de IgM e IgD. As células T1 maturam devido à ação do fator de ativação da célula B (factor ativador da célula B-BAFF) dando origem às células T2. Por fim as células T2 irão desenvolver-se como células B da zona Marginal ou células B foliculares, que são as células B convencionais, que irão migrar para os folículos dos órgãos linfóides secundários. Fenotipicamente, as células B foliculares possuem baixos níveis de IgM e níveis mais altos de IgD à superfície, e irão migrar para os folículos dos nódulos linfáticos, onde podem vir a estruturar centros germinativos na sequência de um processo de ativação das células B pós contato com o antígeno.

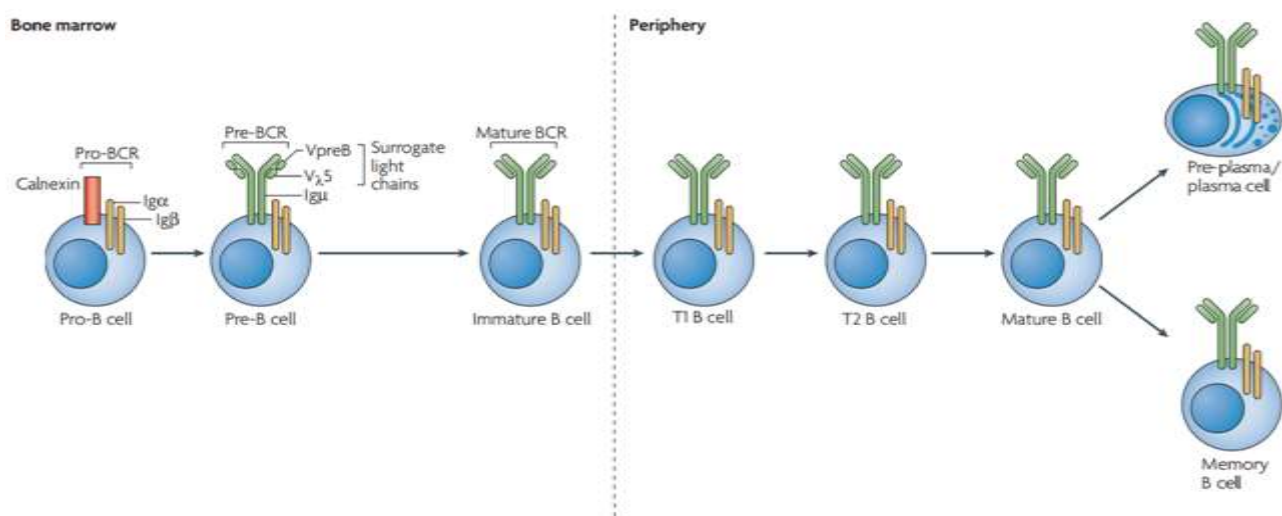


Figura 2 – Esquema dos estadios de desenvolvimento de uma célula B. Adaptado de Cambier, Gauld, Merrell, & Vilen, (2007).

É no centro germinativo que ocorre a hipermutação somática, um processo que vai contribuir para a diversidade do *pool* de anticorpos em cada resposta. Cada célula vai introduzir pequenas alterações nas regiões variáveis das suas imunoglobulinas, e consequentemente, as células que passem a ligar-se ao antígeno com maior afinidade serão as que vão receber sinais de sobrevivência das células dendríticas foliculares, uma população especializada que se encontra especificamente nestas localizações foliculares. O sinal dado pelo reconhecimento do antígeno aderido nas células dendríticas foliculares vai permitir a entrada em proliferação das células B ativadas, para que possam dar continuidade ao seu processo de diferenciação. Em consequência destas interações, acontece um mecanismo de maturação de afinidade, isto é, as células que sobrevivem à sua passagem pelo centro germinativo são as que possuem anticorpos com uma maior afinidade para o antígeno agressor (Lebien & Tedder, 2008).

Funcionalmente, os anticorpos de superfície presentes na membrana das células B maduras atuam como o seu recetor (BCR), internalizando o antígeno que vão depois apresentar às células T, para que se desenvolvam as chamadas respostas humorais Timo dependentes. Neste tipo de resposta, as células T *helper*, após reconhecerem o antígeno que lhes é apresentado nas moléculas de MHC de classe II das células B, contribuem com a ligação do seu CD40 ligando (CD40L) ao CD40 da célula B. A ligação CD40-CD40L é fundamental para que aconteça a mudança de isótipo a partir da IgM inicial, que também é modulada pela presença de diferentes citocinas segregadas pela célula T, como o IFN- $\gamma$  ou a IL-4 (Chaplin, 2010).

Finalmente, as células B ativadas que ultrapassaram todos os processos do centro germinativo irão diferenciar-se em células de memória, com maior tempo de semivida e com capacidade de reagir rapidamente à reexposição ao antígeno, ou em células plasmáticas ou plasmócitos, que regressam à medula óssea onde se mantêm, secretando os respetivos anticorpos.

Existem, pelo contrário, nas respostas Timo Independentes (TI), em que não acontece, ou está limitada, a troca de isótipos ou a geração de memória imunológica. Nestas respostas, a ativação de células B envolve antígenos altamente polimerizados e multivalentes, que não requerem normalmente a ajuda das células T. As respostas TI podem ser divididas em 2 tipos: TI tipo 1 e TI tipo 2. As respostas TI tipo 1 acontecem com o reconhecimento de, por exemplo, Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), com as células B1 a poderem ligar-se ao LPS através do BCR e também de recetores de resposta inata, como é o caso do TLR4. Os antígenos TI tipo 1 têm a particularidade de poderem induzir por isso ativação policlonal. Quando a ligação ocorre via BCR apenas, é um reconhecimento específico pelo que só as células B com especificidade para o LPS são ativadas. Porém, quando há excesso do antígeno, a ligação envolve outros recetores como o TLR4, pelo que células B com diferentes especificidades podem ser ativadas (ativação policlonal). Por outro lado, as respostas TI tipo 2 decorrem do reconhecimento de antígenos altamente repetitivos como os polissacarídeos capsulares bacterianos. Estes antígenos ativam as células B por *crosslinking* de vários BCR, ativando apenas as células B maduras, sem que ocorra a ativação policlonal. A ativação por antígenos multivalentes de células imaturas conduz à sua morte por apoptose (Bekeredjian-Ding & Jegou, 2009; Vos, Lees, Wu, Snappe, & Mond, 2000).

Como já se referiu anteriormente, existem várias classes de anticorpos, nomeadamente IgG, IgE, IgA, IgD e IgM. Todos têm funções, propriedades e localizações distintas.

A IgM é a primeira Imunoglobulina a ser produzida. Encontra-se na forma monomérica à superfície do Linfócito B, desde o estadio de célula imatura. Após a estimulação com o antígeno, a célula B diferencia-se e passa a segregar esta Imunoglobulina sob a forma pentamérica, que pode apresentar assim maior avidéz na ligação a antígenos com múltiplos epítomos, constituindo, quando ligada ao antígeno, um importante elemento de ativação da via clássica do sistema do complemento. Este anticorpo é o primeiro a ser produzido em resposta a um antígeno, e possui um tempo de semivida curto.

A IgG é o principal anticorpo presente no sangue, com o tempo de semivida sérica mais longa de todos os isótipos. Esta imunoglobulina, associada às respostas de memória, possui 4 subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Com exceção da IgG4, as restantes subclasses são importantes na ativação do complemento. Os anticorpos IgG podem também contribuir para a neutralização de toxinas e vírus, e são capazes de passar a placenta.

A IgA está presente em maior quantidade nas mucosas e secreções, incluindo no leite materno. Existem duas subclasses: IgA1 e IgA2. A IgA1 possui uma maior sensibilidade contra proteases, pelo que está maioritariamente presente no soro, ao contrário da IgA2 que está mais presente nas mucosas. Esta imunoglobulina tem a função de proteger as mucosas contra toxinas, vírus e bactérias.

A IgE está associada a reações alérgicas e infeções por parasitas e helmintas. Esta imunoglobulina está sobretudo presente à superfície de mastócitos e basófilos, que possuem o seu recetor de alta afinidade FcεRI (Recetor de IgE de alta afinidade), também expresso em células de Langerhans e eosinófilos.

Por último, a IgD é a imunoglobulina com menor concentração no soro e a sua função não é clara. A IgD é expressa em todas as células B naïve que abandonam a medula óssea, juntamente com a IgM. (Schroeder, & Cavacini, 2010).

#### **1.4 A Resposta Imune – Apresentação de antígenos e a Resposta Adaptativa**

A ligação entre a resposta inata e a resposta adaptativa é assumida pelas células apresentadoras de antígeno (APC). As chamadas células APC profissionais englobam as Células Dendríticas (DCs), os Macrófagos e os Linfócitos B. Estas células diferenciam-se pela sua capacidade de ativar os Linfócitos T, internalizando o antígeno para posterior apresentação. Apenas os macrófagos e as células dendríticas possuem capacidade fagocítica, sendo que as células B internalizam o antígeno via BCR (recetor de célula B). Destes 3 grupos de células, as DCs possuem um papel crucial nos processos de apresentação do antígeno. Estas células realizam fagocitose ainda como célula imatura, migrando de seguida para os nódulos linfáticos, e maturando ao longo do seu percurso, para apresentação do antígeno às células T. Para além da fagocitose, as DCs são capazes de realizar ainda macropinocitose (Kambayashi & Laufer, 2014).

No processo de apresentação de antígeno e ativação de um Linfócitos T existem 3 sinais a fornecer pela célula APC e pelo meio envolvente:

- I. O sinal 1 é dado pela apresentação do antígeno no contexto MHC ao recetor do Linfócito T;
- II. O sinal 2 resulta da interação entre as moléculas coestimuladoras B7.1/CD80 e B7.2/CD86 presentes nas APC, e que se ligam ao seu recetor CD28 e CD152, respetivamente, no Linfócito;
- III. O sinal 3 é mediado pela secreção de citocinas pelas APC, com a função de promover a diferenciação das diferentes subpopulações das células T (Reis e Sousa, 2006).

As células T CD4 podem diferenciar-se em distintas subpopulações celulares, concretamente subpopulações de células como as células Th1, Th2, Th17 ou Treg, dependendo das citocinas que as estimulam (Figura 3). No órgão linfóide secundário, a célula T naïve, diferencia-se em função do estímulo dado pelas APC como já referido. Assim, as células Th1 são maioritariamente induzidas pela expressão de IL-12 e pelo IFN- $\gamma$ . Estas citocinas são importantes para induzir o fator de transcrição T-Bet/STAT1/STAT6 conduzindo à diferenciação desta subpopulação, que irá depois libertar citocinas importantes na ativação de macrófagos e na defesa contra organismos intracelulares.

Por sua vez, o fator de transcrição GATA3/STAT6 é regulado positivamente pelas citocinas IL-4 e IL-2, levando á diferenciação das células em Th2 importantes na defesa de parasitas extracelulares, como os helmintas. Este é o perfil tipicamente associado a alergias e asma, sabendo-se ainda que estas células têm ainda a capacidade de suprimir a proliferação de células Th1, promovendo a sua própria diferenciação através da secreção de citocinas como a IL-4, a IL-5 e a IL-13.

As células Th17 são induzidas por citocinas como a IL-6 e o TGF- $\beta$ , com a ativação dos fatores de transcrição ROR $\gamma$ t/STAT3. Este tipo celular está ligado aos mecanismos de defesa do organismo contra bactérias extracelulares e fungos, estando muitas vezes associado ao desenvolvimento de doenças autoimunes. A IL-17 produzida por esta subpopulação é também importante no recrutamento de neutrófilos para o local de infecção.

Dentro das células T CD4 é reconhecida também uma população de células T reguladoras (Treg), que como o nome indica, são responsáveis por regular e manter o equilíbrio na resposta imunológica incluindo a homeostasia linfocitária. Apesar de terem desenvolvimento tímico, estas células também podem diferenciar-se à periferia quando há produção de TGF- $\beta$  e IL-2, que consequentemente levam à ativação dos fatores de transcrição Foxp3/STAT5.

Para além destas subpopulações de células T CD4 existem ainda as células Th9, que produzem maioritariamente IL-9 e são importantes na inibição de células de melanoma e no recrutamento de células T CD8 (Purwar, R. *et al.*, 2012). Também foram já caracterizadas as células Th22 que expressam IL-22, uma citocina com papel importante na defesa dos queratinócitos contra bactérias (Wolk *et al.*, 2006).

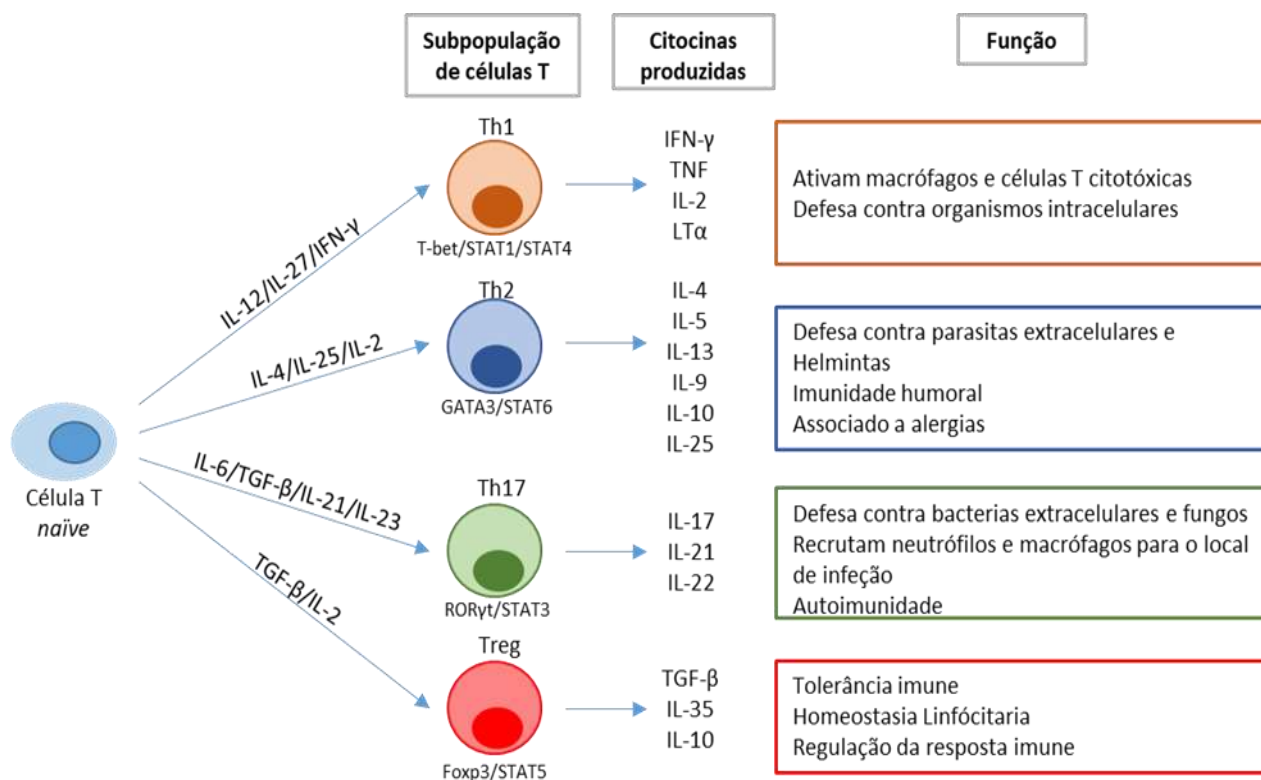


Figura 3 - Diferenciação da linhagem de células CD4 T auxiliaadoras: Funções, fatores de transcrição e citocinas características. Adaptado de Zhu *et al.*, (2008) e Zhang *et al.*, (2013)

Por último, há ainda a salientar a subpopulação de Linfócitos T *helper* foliculares ou Tfh. Estas células Tfh desempenham um papel essencial na diferenciação das células B nos centros germinativos. As células Tfh são definidas pela expressão do seu fator de transcrição, o BCL6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) e também por algumas moléculas de superfície características incluindo CXCR5 (Receptor de quimiocina CXCL5 tipo 5), PD1 (*Programmed cell death protein 1*) e ICOS (*Inducible T Cell Costimulator*) (Zhang *et al.*, 2013).

A diferenciação destas células Tfh engloba várias etapas, ao contrário do que acontece com outras subpopulações T helper, que podem ser induzidas pela exposição a diferentes interleucinas. Quando a célula dendrítica apresenta um péptido a uma célula T naïve, ocorre a libertação de IL-6 e IL-21 que ativa o fator de transcrição BCL6. O desenvolvimento deste tipo celular irá levar à expressão do recetor CXCR5, associado às respostas específicas de Tfh, e vai regular negativamente o CCR7 (receptores de quimiocina CXCL12 tipo 7), que tem a função de recetor quimiotático primário da zona de células T nos órgãos linfóides secundários. O CXCR5 vai permitir também que as células Tfh migrem para a zona folicular do centro germinativo do órgão linfóide secundário. (Chevalier *et al.*, 2011). Por último, as células Tfh expressam tipicamente IL-10 e IL-21, citocinas que possuem capacidade de induzir proliferação, maturação e produção de anticorpos pelas células B.

## 1.5 A Resposta Imune – Citocinas

Na ocorrência de um processo inflamatório, como já descrito anteriormente, a primeira resposta, a resposta inata, é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, mas também por um aumento da migração de leucócitos e da presença de citocinas inflamatórias. Na fase seguinte, quando se estabelecer uma resposta adaptativa, as citocinas vão assumir também várias funções, contribuindo por exemplo para a proliferação de Linfócitos ou para a produção diferencial de anticorpos (Cohen & Cohen, 1996).

Citocinas são então mediadores inflamatórios e potenciadores da resposta imune. Estas pequenas proteínas ligam-se aos seus recetores e podem ter função parácrina, autócrina ou endócrina. As citocinas podem ter função anti-inflamatória ou pro-inflamatória. As pró-inflamatórias são produzidas essencialmente por macrófagos e regulam positivamente as reações inflamatórias, sendo que as anti-inflamatórias têm a função de imunorregulação das anteriores, atuando em conjunto com inibidores, antagonistas e recetores solúveis (Zhang & An, 2007). De facto, a regulação da função das citocinas ocorre pela ação de inibidores e antagonistas, mas por outro lado o seu efeito depende do tempo de libertação, do local em que atuam e se encontram, da presença de elementos competidores ou sinérgicos, ou da quantidade dos seus recetores disponíveis. É importante salientar também que as citocinas têm funções pleiotrópicas, isto é, uma citocina pode atuar em vários tipos celulares, sabendo-se também que diferentes células podem produzir a mesma citocina (Corwin, 2000).



As citocinas podem ainda ser divididas em subgrupos: Interferões, (relacionados com infeções virais); fatores estimuladores de colónias (envolvidos na divisão e diferenciação de células da medula óssea e precursores de leucócitos); quimiocinas (citocinas com funções quimiotáticas, que recrutam leucócitos e outras células para o local de infeção); fatores transformadores de crescimento (controlam a divisão e reparação tecidual) e Interleucinas (produzidas sobretudo por leucócitos, incluindo Linfócitos) (Male, Brostoff, Roth, & Roitt, 2012).

A atividade das Interleucinas está presente nos vários níveis e tipos de resposta imune. Este tipo específico de citocinas é normalmente expresso para uma rápida resposta dos leucócitos. Salientam-se no contexto da resposta inata aguda Interleucinas como a IL-6 e a IL-1, com funções pleiotrópicas e sobrepostas. Entre outras, estas citocinas pró-inflamatórias são capazes de ativar as células endoteliais e os leucócitos localizados no local de inflamação, promovendo a expressão de moléculas de adesão (Zhang & An, 2007), mas, por outro lado, contribuem também para determinar a via específica de diferenciação das subpopulações de células T *helper*, assumindo ainda um papel importante na diferenciação e proliferação das células B. De facto, estas duas Interleucinas estão profundamente interligadas: foi demonstrado que a IL-1 estimula a produção e libertação de IL-6 pelas células endoteliais e pelos macrófagos (Liu *et al.*, 2015). Por seu lado, a IL-6 vai conduzir depois à produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Em conjunto com o TNF-alfa vão também contribuir para o aumento da temperatura corporal, através da promoção do mediador proximal de febre, a prostaglandina-E2 (PGE2). A IL-1 $\beta$  e IL-6 aumentam a produção de PGE2 no cérebro, atuando mutuamente para regularem as suas funções. Assim, estas Interleucinas podem ser importantes fatores preditivos de várias patologias e infeções, podendo os seus valores ser monitorizados para avaliar a severidade e evolução de doenças como Pneumonias, funcionando neste contexto como biomarcadores (Andrijevic, Matijasevic, Andrijevic, Kovacevic & Zaric, 2014; Lilisari, Nataprawira, & Gurnida, 2016).

## 1.6 Interleucina 1

A família da IL-1 é vasta, compreendendo 11 membros, dos quais 7 são intrinsecamente pró-inflamatórios (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-6 $\beta$  e IL-36 $\gamma$ ) e 4 atuam como antagonistas destes processos (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-37 e IL-38), exercendo atividades anti-inflamatórias (Akdis *et al.*, 2016).

A IL-1 é um mediador pró-inflamatório crucial tanto na fase aguda da resposta inflamatória, como na inflamação crónica sendo também um dos indutores da imunidade inata. A IL-1 pode ter função autócrina induzindo a sua própria produção (Rider *et al.*, 2011). A produção desta proteína e a sua libertação causam a síntese e expressão de mediadores de inflamação, como a própria IL-6 (Gądek-Michalska & Bugajski, 2010).

A IL-1 é produzida maioritariamente por macrófagos, mas também por outras células, incluindo monócitos, Linfócitos, queratinócitos, células da microglia, megacariócitos, neutrófilos, fibroblastos, ou mesmo células epiteliais e endoteliais. As principais funções da IL-1 incluem a indução de proteínas pró-inflamatórias, a promoção da hematopoiese e a diferenciação de células T CD4 naïve em células Th17 (Akdis *et al.*, 2016).

Existem dois tipos de IL-1: a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . A IL-1 $\alpha$  é a forma biologicamente ativa da pró-IL-1 $\alpha$ . Como é predominantemente ligado à membrana, a IL-1 $\alpha$  tem um papel sobretudo local e não sistémico. (Dinarello, 1994). Pelo contrário, a IL-1 $\beta$  é a principal forma circulante de IL-1. A IL-1 $\beta$  é produzida inicialmente sob a forma de pró-IL-1 $\beta$ , uma molécula que é ineficaz até ser ativada pelo inflamassoma NLRP3 e pela caspase-1, quando ocorrem estímulos inflamatórios (Agostini L. *et al.*, 2004). Quer a IL-1 $\alpha$ , quer a IL-1 $\beta$  podem ser bloqueadas por antagonistas, como é o caso do IL-1Ra (Akdis *et al.*, 2016). Contudo, a sua ação é normalmente mediada por outros recetores, chamados de tipo I ou tipo II, sendo sobretudo aos recetores de tipo I, com maior afinidade, que se associam as funções biológicas da IL-1 (Sims *et al.*, 1993).

A família de recetores da Interleucina 1 inclui corretores, proteínas de ligação e recetores inibitórios. Esta família de recetores compreende 10 membros: IL-1R1, IL-1R2, proteína acessória IL-1R (IL-1RAcP), IL-18Ra, IL-18Rb, ST2 (ou IL-33R), IL-36R, SIGIRR (Receptor único de Ig da Interleucina 1), TIGGIR-2 (*three Ig domain-containing IL-1R related-2*) e TIGGIR-1 (*three Ig domain-containing IL-1R related-1*). Com exceção do SIGIRR, que compreende apenas um único domínio extracelular Ig-like, todos os outros recetores possuem 3 domínios extracelulares Ig-like. Há homologia entre os recetores *Toll-like* e a família de recetores da IL-1 no que se refere aos seus domínios intracelulares, chamados de domínios *Toll-like* / IL-1R (TIR) (Born *et al.*, 2000).

Quando a IL-1 liga-se ao seu recetor, o complexo terciário formado pela IL-1 e pelos seus recetores recrutam moléculas intracelulares, levando a uma série de eventos de ativação em cascata. Esta ativação ocorre inicialmente em moléculas como o fator de diferenciação mieloide (MyD88), a cinase associada a IL-1R (IRAK) e o recetor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6), que vai conduzir à ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), bem como do fator p38, da cinase N-terminal de c-Jun (JNK), da cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e de proteínas cinases ativadas por mitogénio (MAPK) (Palomo, Dietrich, Martin, Palmer, & Gabay, 2015). Decorrente destes processos, vai iniciar-se na célula-alvo em ativação (que pode ser um monócito ou um macrófago, uma célula epitelial, uma célula endotelial, entre outras) a transcrição de diferentes genes, incluindo os próprios genes que codificam a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , de modo a amplificar a resposta inflamatória e portanto, a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  podem atuar de forma parácrina ou autócrina (Nomura *et al.*, 2018). Dentro desta família de recetores, o SIGIRR está associado a mecanismos de regulação negativa em condições inflamatórias e sabe-se que uma deficiência neste recetor leva a uma resposta imunitária mais forte, com concentrações elevadas de fibrinas nos vasos sanguíneos e elevados valores plasmáticos da selectina P. (Wald *et al.*, 2003; Anselmo *et al.*, 2016).

Os níveis séricos de IL-1 variam conforme a patologia que se apresenta no indivíduo, no entanto não são bem definidos na literatura. Controlos saudáveis parecem possuir valores inferiores a 1 pg/mL, enquanto doentes com outras comorbilidades apresentam valores mais altos (Antonelli *et al.*, 2009; Iorio, 2003).

## 1.7 Interleucina 6

A Interleucina 6 é um importante mediador da inflamação. É produzida no curso normal de uma infeção ou lesão tecidual.

Na resposta Inata possui uma função importante estimulando os hepatócitos a produzir proteínas de fase aguda como PCR, amiloide sérico A, fibrinogénio, hepcidina, haptoglobina, ou alfa-1 anti tripsina. Esta Interleucina pode ainda estimular a produção de IL-8, que possui capacidades quimiotáticas para neutrófilos, atraindo-os para o local de infeção. Foi demonstrado em ratinhos que esta proteína possui ainda efeitos pirogénicos quando se liga ao seu recetor das células endoteliais do cérebro, levando à produção e Prostaglandina E2, presente no hipotálamo, e responsável pelo aumento da temperatura corporal (Eskilsson *et al.*, 2014).

Na imunidade adaptativa, a IL-6 aumenta a produção de Anticorpos, atuando sobre as células B, e promove a diferenciação das células T CD4 em células Tfh ou células Th17. Esta proteína pode ser produzida por células dendríticas, Linfócitos B, Linfócitos T, neutrófilos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, adipócitos, entre outras (Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014).

A IL-6 partilha transdutores de sinal com outras moléculas, como a IL-11, o fator inibitório da leucemia (LIF), a oncostatina M (OSM), o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e a cardiotrofina-1 (CT-1). Existem 2 formas de sinalização após reconhecimento de IL-6: uma via clássica e a via de sinalização *trans*. Na via de sinalização clássica, a IL-6 liga-se ao recetor de IL-6, o IL-6R, que consiste numa proteína de ligação a IL-6 (a cadeia  $\alpha$  ou CD126) e uma glicoproteína ligada à membrana, a gp130. O IL-6R é expresso na membrana de hepatócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e alguns tipos de Linfócitos (Rose-John S. *et al.*, 2006). O IL-6R forma um complexo com a gp130 membranar destas células em quase todos os órgãos (rim, baço, fígado, pulmão, placenta e cérebro). Quando a IL-6 se liga ao seu recetor, ocorre a dimerização e ativação da gp130 e, consequentemente, dá-se início à transdução do sinal. No entanto, na via de *trans*-sinalização, a IL-6 liga-se a seu recetor solúvel (sIL-6-R), presente na maioria dos fluidos corporais, e é agora o complexo IL-6 / sIL-6R que ativa a gp130. Esta via de *trans*-sinalização tem importantes efeitos biológicos, uma vez que a presença de um recetor solúvel permite ativar células que normalmente não respondem à IL-6. De facto, enquanto a expressão de IL-6R varia entre diferentes tipos de células, a proteína gp130 é ubiquamente expressa em níveis constantes em todas as células (Jones, S.A. *et al.*, 2011). Em suma, através das vias de sinalização clássica e *trans*, a IL-6 ativa o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 3 (STAT3) por fosforilação despoletando diferentes funções nas células que a reconheçam (Jones, Scheller, & Rose-John, 2011).

É importante salientar ainda que existe uma forma solúvel da gp130 (sgp130), com alta afinidade para o complexo IL-6 / sIL-6R, e cuja função é exatamente inibir a ligação do complexo IL-6 / sIL-6R ao seu recetor (Jostock *et al.*, 2001). Contudo, um estudo recente demonstrou que a quantidade de sgp130 presente no soro é insuficiente para inibir o complexo IL-6 / sIL-6R da trans-sinalização e que a quantidade de complexos IL-6 / IL-6R e IL-6 / sIL-6R / sgp130 formados ocorrem com menos frequência, deixando mais espaço para a sinalização de vias clássicas (Baran *et al.*, 2018).

Recentemente, Schwerd e colaboradores estudaram um doente com uma mutação homozigótica na IL-6ST, que codifica a gp130. Quando as células deste doente foram estimuladas *in vitro* com citocinas dependentes de gp130, tal como IL-6, notou-se uma perda completa da sinalização da via da IL-6 em células T, células B e monócitos. Registaram ainda que o doente tinha uma história clínica com várias infeções bacterianas e níveis baixos de Proteína C Reativa e fibrinogénio (Schwerd *et al.*, 2017), o que parece corroborar o papel da IL-6 e do seu recetor na resposta imune.

Os intervalos de referência para os níveis séricos de IL-6 não estão bem definidos na literatura, havendo, contudo, evidências de que os valores médios de IL-6 em doentes com pneumonia (Bian, Wu, & Zhang, 2017) ou com Sepsis (Lin *et al.*, 2015) são mais elevados do que os níveis de controlos saudáveis. Curiosamente, também doentes com transtorno depressivo maior (MDD) e esquizofrenia (Al-Hakeim *et al.*, 2005) parecem apresentar níveis séricos de IL-6 mais elevados. De facto, a IL-6 tem vindo a ser identificada como um biomarcador neuro-inflamatório implicado em várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson (Dursun *et al.*, 2015).

## **1.8 Autoimunidade e o desenvolvimento de anticorpos anti-interleucinas**

A perda de tolerância às proteínas do *self* leva ao desenvolvimento de respostas autoimunes patológicas. Nestes cenários, ocorre muitas vezes a produção de anticorpos capazes de se ligarem a proteínas do próprio organismo, desencadeando assim uma resposta imune contra o tecido ou órgão onde se encontrem essas proteínas. Na génese das doenças autoimunes podem encontrar-se diversos fatores, desde elementos que conferem predisposição genética, como também *triggers* ambientais ou mecanismos como o mimetismo molecular, entre outros.

Do ponto de vista da predisposição genética para doenças autoimunes, parece de particular relevância o complexo dos genes HLA (Antigénio Leucocitário Humano), o MHC humano. Na realidade, é nesta região génica que se codificam as moléculas responsáveis pela apresentação dos antígenos, e que, portanto, podem condicionar o tipo de moléculas a apresentar e a forma como serão apresentadas. Ou seja, a maior ou menor capacidade de apresentação de determinado antígeno por parte das moléculas de MHC de um indivíduo pode condicionar a suscetibilidade desse indivíduo ao antígeno em causa.

Por outro lado, a apresentação no contexto MHC é também um dos pilares da correta distinção entre *self* e *non-self*, que permite não só uma adequada seleção de repertório T, mas que também vai contribuir posteriormente para uma adequada ativação das respostas T.

Várias doenças autoimunes têm vindo a ser associadas a determinados antígenos HLA. Os casos mais evidentes são por exemplo a associação do antígeno HLA B27 com o risco para o desenvolvimento de Espondilite anquilosante, ou a Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1), onde os alelos HLA DR3 e HLA DR4 também parecem ter maior prevalência entre os indivíduos com doença. Por outro lado, o gene HLA-DRB1 é também interessante, uma vez que diferentes alelos podem associar-se a maior ou menor risco para o desenvolvimento de Artrite reumatoide. Várias outras associações têm sido descritas para doenças como a Esclerose múltipla, o Lupus eritematoso sistémico, ou a síndrome de Sjögren (Viatte *et al.*, 2015; Rojas *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2016; Charfi *et al.*, 2019; Schweiger *et al.*, 2016).

Entre os antígenos do *self* potencialmente reconhecidos pelas células T num contexto de apresentação MHC, podemos encontrar, entre outros, citocinas. A suportar esta afirmação, reconhecemos atualmente que o número de publicações sobre anticorpos anti citocinas (AACi) tem vindo a aumentar nas últimas décadas, levando à identificação e caracterização de um número cada vez maior destes autoanticorpos, que surgem com afinidade para diferentes citocinas (Cappellano *et al.*, 2012). Embora desde 1981 se reconheça a presença de autoanticorpos anti citocinas inflamatórias, a relevância da presença destes anticorpos no soro de doentes e pessoas saudáveis tem sido um foco de discussão nos últimos anos. O aumento da prevalência de doenças autoimunes e a tentativa de melhor compreender os seus mecanismos fisiopatológicos, têm sido talvez dos fatores que mais têm promovido o interesse da comunidade científica por estes autoanticorpos. De facto, tem sido crescente a tentativa de estudar a presença de AACi e o seu papel no estabelecimento de doenças autoimunes e inflamatórias, mas também o seu potencial reparador *in vivo* e *in vitro* (Cappellano *et al.*, 2012).

Inicialmente relatados apenas em doentes com patologias inflamatórias crónicas, tem sido descrita a presença destes anticorpos em indivíduos saudáveis, sendo que a sua presença tem vindo a ser cada vez mais interpretada e relacionada como um potencial elemento determinante para o desenvolvimento de imunodeficiências adquiridas, desregulação imune e autoimunidade. O significado da presença de AACis em indivíduos saudáveis não está, porém, definitivamente estabelecido. Aliás, há evidências de que possam desempenhar um papel na regulação fisiológica das atividades biológicas das citocinas, quer pela sua neutralização, quer pela possibilidade de prolongarem a semivida da citocinas ao formarem com ela complexos citocina-anticorpo (Knight, Merkel, & O'Sullivan, 2016). Em concreto, a presença de anticorpos anti-IL-2, anti-IL-8, anti TNF- $\alpha$  e anti- Factor estimulador de Colónias de Granulócitos-Macrófagos (anti-GM-CSF) parece ser generalizada em indivíduos saudáveis, que podem apresentar também AACi como os anticorpos anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-IFN- $\gamma$ . Pelo contrário, a presença de autoanticorpos como o anticorpo anti-IL-3, o anticorpo anti-osteopontina e o anticorpo anti-Factor estimulador de Colónias de Granulócitos (anti-G-CSF) não tem sido descrita em indivíduos saudáveis.

Temporalmente, e de acordo com o descrito na literatura, os anticorpos anti citocinas inflamatórias podem estar presentes desde o nascimento, mas as suas concentrações parecem ir aumentando com a idade, talvez resultado de múltiplos estímulos inflamatórios. Em indivíduos sob terapêuticas imunomoduladoras, a concentração de anticorpos anti citocinas inflamatórias pode aumentar exponencialmente, com consequências importantes no curso da doença. É o caso de doentes com Hepatite C tratados com Interferão- $\alpha$  e que ficam resistentes à terapêutica pelo desenvolvimento de anticorpos anti-IFN. Atualmente, a presença de autoanticorpos tem vindo a ser reportada como estando sobretudo associada a doenças autoimunes e a doenças do foro infeccioso, tal como se representa na Figura 4.

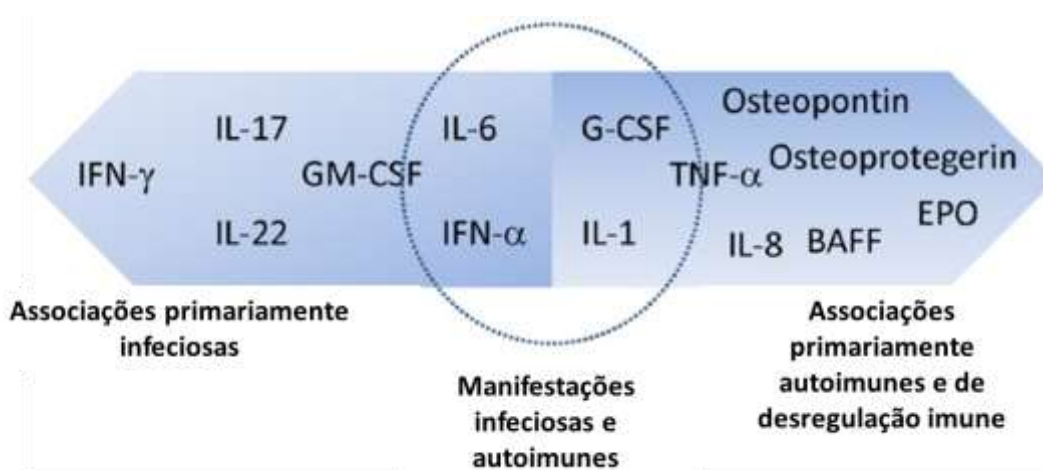


Figura 4 – Associação entre a presença de diversos autoanticorpos anticitocinas e diferentes manifestações de doença. Adaptado de Knight *et al.* (2016).

Como acima referido, tem sido descrita a presença de autoanticorpos anti citocinas que atenuam a gravidade de determinadas doenças por mecanismos de bloqueio da atividade das respetivas citocinas (ex: Síndrome de Sjögren, Artrite Reumatoide e outras doenças do tecido conjuntivo). Nestas doenças com autoimunidade, a presença de maior concentração de autoanticorpos pode levar a menor gravidade da doença, uma vez que o bloqueio das citocinas que são reconhecidas pelos autoanticorpos tem um efeito anti-inflamatório.

Olhando em particular para a DMT1, ou Diabetes Mellitus dependente de insulina, esta doença caracteriza-se por uma doença autoimune órgão-específica. Os doentes apresentam uma deficiência na produção de insulina como resultado da destruição das células  $\beta$  do pâncreas, existentes nos ilhéus de Langerhans (Castano & Eisenbarth, 1990) por parte da resposta imune, que ataca de forma significativa estes tecidos. Entre outras evidências da ocorrência de respostas autoimunes na DMT1, esta morbilidade tem vindo a ser associada à presença anómala de autoanticorpos.

Tipicamente encontram-se presentes anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpos anti descarboxilase do ácido glutâmico (GADA ou GAD), anticorpos anti tirosina fosfatase (IA2) e anticorpos anti-transportador 8 do Zinco (ZnT8A) (Long, Gillespie, Rokni, Bingley, & Williams, 2012). Apesar de existirem poucas referências a anticorpos anti citocinas na literatura, Pérol e colaboradores identificaram recentemente que a IL-2 é um alvo autoimune extrapancreático nos modelos de DMT1 (Pérol *et al.*, 2016).

De facto, as citocinas possuem nesta doença um papel preponderante como moduladores de resposta que podem conduzir ao estabelecimento de respostas autoimunes e à destruição das células  $\beta$ , ou pelo contrário, levar à supressão destas respostas (Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 2003). Um estudo realizado por Meyer e colaboradores, em 2016, avaliou os níveis séricos de IFN $\alpha$  em doentes com e sem DMT1. Estes autores verificaram que os indivíduos sem doença, mas que possuíam anticorpos anti-GAD65/GAD67 (bio marcadores de início provável de DMT1), apresentavam valores mais elevados de autoanticorpos anti-IFN $\alpha$  do que os doentes com DMT1 diagnosticada. Estas observações sugerem a possibilidade de estes anticorpos serem benéficos e com eventual papel protetor, impedindo o desenvolvimento da doença (Meyer *et al.*, 2016).

Parece evidente, portanto, que *in vivo*, a presença de AACi pode ou não estar ligada ao desenvolvimento de doença, já que estes autoanticorpos podem assumir um papel regulador e modelador das citocinas que reconhecem, quer sejam produzidos pelo próprio organismo, quer sejam introduzidos no doente para fins terapêuticos ou se desenvolvam em resposta a diferentes terapias (Spohn, Arenas-Ramirez, Bouchaud, & Boyman, 2017; Courtney, Phelps, & Karavodin, 1994). De facto, são vários os relatos na literatura que se referem à presença sérica de anticorpos anti-interleucinas numa percentagem muito significativa de indivíduos saudáveis (Watanabe *et al.*, 2007), mas, como se percebe, há ainda muito por esclarecer acerca do modo de produção destes anticorpos e do seu real efeito no corpo humano.

Em teoria, há dois tipos mecanismos que podem levar à presença de autoanticorpos: mecanismos diretos e mecanismos indiretos. Nos mecanismos diretos, os péptidos das citocinas podem ser apresentados por células apresentadoras de antígenos e reconhecidos pelas células T através dos respetivos TCR. Estas células T ativadas irão de seguida interagir com células B, também com recetores com alguma afinidade para estes antígenos do *self*, promovendo-se assim a produção de anticorpos autoimunes. Como é óbvio, as células T autorreativas deveriam ter sido excluídas do timo nos processos de seleção negativa. Contudo, estão reconhecidas várias situações nas quais existem defeitos ao nível da seleção negativa, como o que acontece em doentes com Timomas ou com a imunodeficiência associada ao gene AIRE, designada por APS1/APECED (Síndrome poliglandular autoimune tipo 1/Poliendocrinopatia autoimune candidíase-distrofia ectodérmica). Nestas últimas, ocorre um distúrbio na função do gene AIRE e por isso há défice na expressão de autoantígenos dos tecidos na medula do timo, permitindo-se que um número inadequado de timócitos autorreativos sobrevivam por não encontrarem no timo estes antígenos. Ou seja, a seleção negativa fica comprometida e desenvolvem-se na periferia manifestações autoimunes, que podem condicionar também a produção de autoanticorpos depois pelas células B (Scarpino *et al.*, 2007).

Nos mecanismos indiretos, por outro lado, pode acontecer que as citocinas sejam acopladas a proteínas transportadoras imunogénicas, que vão mediar o reconhecimento pelas células T num contexto de apresentação por células APC. Há também evidências de que as células T possam reconhecer análogos de citocinas, isto é, moléculas que mimetizam a citocina endógena, como acontece frequentemente em contextos de infeção viral. Por exemplo, é produzida, pelo vírus Epstein Barr, uma citocina análoga à IL-10 (Jog, Chakravarty, Guthridge, & James, 2018).

De volta aos mecanismos indiretos, uma vez reconhecidos estes péptidos pelas células T, pode dar-se início à interação com as células B, desenvolvendo-se uma reação de centro germinativo. A ativação de células B com especificidades próximas para os péptidos análogos ou para os péptidos carregados por transportadores condicionará a produção de anticorpos que apresentarão depois reatividade cruzada para a citocina nativa (Bendtzen, Hansen, Ross, & Svenson, 1998). Neste sentido, está comprovada a indução de anticorpos anti-IFN- $\beta$  após terapia com análogos desta citocina em doentes com esclerose múltipla (Antonelli *et al.*, 1998), existindo também na literatura relatos de vários análogos virais de diferentes citocinas (Spriggs, 1996).

À imagem do que se refere acima para a terapia com IFN- $\beta$  em esclerose múltipla, há vários estudos suportam os benefícios da administração de citocinas no tratamento de algumas doenças. Neste contexto, porém, é importante não esquecer que esta administração pode levar a que seja montada uma resposta imunológica, sobretudo à custa da produção de autoanticorpos (Antonelli *et al.*, 1998).

Por outro lado, têm sido identificados autoanticorpos anti citocinas em doentes com neoplasias tímicas, inclusive anticorpos anti-IL-1 e anti-IL-6 (Burbelo *et al.*, 2010). Ora, o espectro de infeções oportunistas identificadas neste tipo de neoplasias sugere que combinações de diferentes autoanticorpos possam contribuir para padrões únicos de suscetibilidade a infeções. É também aceite que a exposição a determinados fatores ambientais, sobretudo a presença de elementos que causem agressão ou lesão, ou mesmo situações que induzam stress celular, pode contribuir também para a produção de autoanticorpos e o desenvolvimento de doenças autoimunes (Szodoray *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012).

Caracteristicamente, os anticorpos anti citocinas existem em baixa quantidade em circulação, mas têm alta afinidade para o seu substrato. Considerando, por outro lado, a sua estrutura, é reconhecido que a maioria dos autoanticorpos anti citocinas identificados é da classe IgG, o que sugere que a sua formação seja decorrente de uma resposta em que há interação entre as células T e as células B no centro germinativo, como aliás se expôs na descrição dos mecanismos diretos e indiretos acima referidos. A comprovar a importância destes eventos foliculares na diferenciação do repertório B, Hervé e colaboradores, em 2007, estudaram doentes com deficiências de CD40L e de MHC de classe II. Curiosamente observaram-se em ambos os grupos de doentes proporções elevadas de células B autorreativas, o que parece reforçar que as interações CD40/CD40L e a apresentação de antígenos no contexto MHC II, que medeiam as interações B-T nas fases de cativação, são etapas importantes para o estabelecimento da tolerância periférica. (Hervé *et al.*, 2007).



Por outro lado, a presença de um número reduzido de células Treg em ambas as populações de doentes parece ser também um achado relevante, já que esta é uma população celular intrinsecamente envolvida na regulação e indução de tolerância nas respostas imunes periféricas.

À luz do conhecimento atual, 3 possíveis mecanismos de atuação fisiológica podem ser considerados para os anticorpos anti citocinas inflamatórias:

- i) Podem assumir um papel anti-inflamatório, com redução da inflamação provocada pelas citocinas que reconhecem;
- ii) Podem funcionar como um reservatório de citocinas, já que aumentam a semivida das citocinas a que estão ligados;
- iii) Podem promover a ativação de recetores que as citocinas livres não conseguiriam ativar.

Em suma, e tal como já se referiu anteriormente, apesar de poderem apresentar efeitos diversos, a presença de autoanticorpos anti-interleucinas pode levar a uma neutralização das suas funções, colocando em causa a normal resposta imune, i.e., condicionando o desenvolvimento de um quadro de imunodeficiência. Porém, enquanto as imunodeficiências congénitas primárias apresentam normalmente manifestações precoces, as síndromes de autoanticorpos anti-interleucinas tende a surgir mais tarde, por vezes mesmo na idade adulta apenas. Pode até dizer-se que se manifestam como uma forma mais branda de imunodeficiência, com uma história de evolução com ciclos de agravamento ou melhoria do quadro, já que é mais dependente de processos dinâmicos como o título dos anticorpos presentes ou a sua avidéz (Browne & Holland, 2010). De seguida abordaremos especificamente o mais relevante na literatura acerca dos autoanticorpos anti-IL-1 e anti-IL-6.

## **1.9 Anticorpos anti-Interleucina 1**

Apesar de não haver muitos estudos que abordam a presença destes autoanticorpos, existem evidências de que, em doentes com fibrose pulmonar idiopática, a presença de autoanticorpos anti-IL-1 $\alpha$  pode ser um elemento regulador desta interleucina durante o curso da infeção pulmonar (Ogushi *et al.*, 2001).

De facto, a superprodução de IL-1, eventualmente induzida também por fatores externos que vão desde o excesso de sal na alimentação, a poluentes ambientais, tabagismo e álcool, combinados com a suscetibilidade genética, pode levar à produção de autoanticorpos reguladores, mas também ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como é o caso da Artrite reumatoide (AR) (Sigaux, Semerano, Favre, Bessis, & Boissier, 2018; Hart, Laden, Puett, Costenbader, & Karlson, 2009; Costenbader, Chang, Vivo, Plenge, & Karlson, 2008; Lu, Solomon, Costenbader, & Karlson, 2014).

A AR é uma doença crónica autoimune que causa destruição articular progressiva e outras comorbilidades. A etiopatogenia da doença, considerada a artropatologia crónica mais prevalente em todo o mundo, não está ainda esclarecida, mas parece haver fatores como o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e a IL-6. Considerando a IL-1 como um relevante mediador inflamatório da AR, o bloqueio da IL-1 pode trazer melhorias efetivas nos sintomas da doença e ser ainda um elemento usado no seguimento e monitorização dos doentes (Jouvenne *et al.*, 1996; Dayer, 2003). De facto, doentes com AR que apresentam autoanticorpos anti-IL-1 $\alpha$  parecem possuir uma forma de doença menos destrutiva (Maniwa *et al.*, 2000; Lindqvist, Eberhardt, Bendtzen, Heinegard, & Saxne, 2005). Além disso, está também provado que a administração de anticorpos monoclonais contra a IL-1 contribui para a diminuição da inflamação em doentes com AR (Alten *et al.*, 2008). Portanto, a presença de anticorpos anti-IL-1, endógenos ou exógenos, pode ter efeitos benéficos em algumas doenças, ou, de todo, não.

Dentro da família da IL-1, a IL-1 $\beta$  é o membro mais estudado devido ao seu papel na mediação da doença autoinflamatória, e às suas importantes interações sistémicas, por oposição à IL-1 $\alpha$  de ação mais local. A importância da via de ativação mediada pela IL-1 é patente não só pela expressão semelhante no reino animal (sendo por isso evolutivamente conservada) como pela gravidade das patologias associadas a defeitos na sua ativação nomeadamente as Imunodeficiências primárias associadas a mutações em MyD88, IRAK4, NEMO e IKBA nas quais os doentes afetados correm risco aumentado de infeções invasivas (meningite, Sepsis, artrite, osteomielite e abscessos) a *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O conhecimento aprofundado do papel desta citocina na doença bem como da sua desregulação permitiu desenvolver 3 autoanticorpos com papel terapêutico: anakinra, que bloqueia IL-1R1, inibindo a atividade quer da IL-1 $\beta$  quer da IL-1 $\alpha$ ; Canakinumab que inibe o IL-1 $\beta$ ; e o rilonacept, um inibidor da IL-1 conhecido também como IL-1 Trap.

Reconhecendo o potencial inflamatório da IL-1 $\beta$ , estudos recentes abordaram a presença e a função deste AACi no contexto das respostas imunes inflamatórias. Curiosamente, os dados em diferentes modelos animais demonstraram que durante uma resposta imune ocorre formação de anticorpos anti-IL-1 $\beta$ . Contudo, embora em determinadas circunstâncias estes autoanticorpos apresentassem capacidades de inibição da citocina, Spohn e colaboradores verificaram sobretudo uma função protetora para os mesmos autoanticorpos, que inclusivamente parecem poder melhorar a atividade da citocina em doenças inflamatórias e autoimunes. O que determina, porém, se as respostas dependentes destes autoanticorpos resultam fenómenos agonistas ou verdadeiramente neutralizantes é, contudo, uma questão difícil. Tipicamente, um AACi agonista normalmente atinge um dos epítomos de ligação ao recetor da citocina em questão, mas nem sempre esta condição se verifica, como foi o caso dos estudos com o modelo animal para os anti-IL-1 $\beta$  (Spohn *et al.* 2017). No humano, a prevalência de autoanticorpos séricos anti-IL-1 não está ainda bem definida. Apesar de os AACis serem considerados muito prevalentes em indivíduos saudáveis os valores de IgG anti-IL-1 $\alpha$  parecem oscilar entre 0,5-27ng/mL (Svenson, Hansen, & Bendtzen, 1990), mas não há intervalos definidos.

### 1.10 Anticorpos anti-Interleucina 6

A percepção de que existem autoanticorpos naturais anti-IL-6 tem recebido o interesse da comunidade científica, considerando-se por um lado o seu potencial terapêutico, já que as vias de ativação da IL-6 estão intimamente ligadas a várias condições de doença. Mas, por outro lado, se tiverem efeitos inibidores, estes autoanticorpos podem ser relevantes no estudo de complicações infecciosas, uma vez que é inequívoco o papel da IL-6 no estabelecimento de respostas imunes eficientes.

De acordo com um estudo dinamarquês que avaliou mais 4000 doadores saudáveis, cerca de 9% da população saudável apresenta títulos baixos estáveis de autoanticorpos anti-IL-6, enquanto que a prevalência de títulos elevados é de apenas 1% (von Stemmann *et al.*, 2017)

*In vitro*, quando há altas concentrações destes autoanticorpos, observa-se uma atividade inibitória dos anticorpos em relação à atividade da citocina (Galle, Svenson, Bendtzen, & Hansen, 2004). Como já se referiu para a IL-1, as capacidades inibitórias dos anticorpos anti citocinas podem ser aplicadas no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, como é o caso da AR. Vários tratamentos têm vindo a focar-se na utilização de anticorpos direcionados para citocinas inflamatórias. O tocilizumab é um agente biológico composto por anticorpos monoclonais humanizados, produzidos em ratinhos. Reconhece a IL-6 humana e bloqueia sua atividade, impedindo a ligação da IL-6 ao recetor IL-6R / gp130 ou ao sIL-6R solúvel (Nishimoto & Kishimoto 2006).

Considerando dados experimentais em modelos animais, a presença de autoanticorpos anti-IL-6 não parece afetar as atividades biológicas da citocina (Galle *et al.*, 2004). No entanto, outros estudos mostraram que anticorpos anti-IL-6 podem não apresentar capacidade neutralizadora da IL-6, mas pelo contrário prolongar a semivida da citocina, protegendo-a de uma eventual degradação e aumentando a sua biodisponibilidade em algumas doenças. Isto mesmo foi evidenciado em doentes com imunodeficiências como APECED e ou doentes com Timoma. Em ambos os casos, os doentes que apresentavam uma maior concentração sérica de anticorpos anti-IL-6 evidenciaram um aumento significativo dos valores séricos de IL-17A em relação aos doentes seronegativos para autoanticorpos anti-IL-6 e aos controlos saudáveis, que curiosamente não evidenciaram níveis significativos destes autoanticorpos. Estes dados sugerem que estes autoanticorpos poderiam assim potenciar indiretamente a resposta Th17, o que passa pela manutenção da atividade da IL-6 (Kärner *et al.*, 2016). Também em doentes com esclerose sistémica se observaram concentrações mais elevadas de IL-6 quando no soro dos doentes estavam presentes autoanticorpos anti-IL-6 (Suzuki H. *et al.*, 1994).

No entanto, Puel e colaboradores, em 2007, descreveram o primeiro caso de um doente com autoanticorpos IgG1 circulantes, de alta afinidade, específicos para IL-6. De acordo com os autores deste estudo, os anticorpos anti-IL-6 circulantes estariam associados à ocorrência de infeções graves, como celulite estafilocócica e abscessos subcutâneos. Verificou-se, neste caso, que as células sanguíneas do doente tinham um défice na secreção de IL-6, e que durante os períodos de doença infecciosa ativa se observaram valores

baixos ou mesmo inexistentes de PCR (Puel *et al.* 2007). Também em doentes com infeções bacterianas graves foram reportados autoanticorpos anti-IL-6, concomitantes com valores baixos de proteína C reativa (Nanki *et al.* 2013).

A escolha de anticorpos anti-IL-6 como outro foco deste estudo deve-se, assim, ao importante papel pró-inflamatório que esta interleucina tem enquanto citocina pró-inflamatória e promotora da Proteína C Reativa (PCR). A função biológica da IL-6 é atingida através da sua ligação ao complexo recetor constituído pelo IL-6R $\alpha$  (CD 126) e pela proteína gp130, que vão ativar múltiplas vias de transdução, tais como JAK/STAT 3, ERK e PI3K, com subsequente ativação da cascata inflamatória.

Em síntese, e à imagem do anteriormente considerado para autoanticorpos anti-IL-1, também os autoanticorpos anti-IL-6 podem ter várias funções, podendo ser elementos de neutralização ou pelo contrário, ligando-se à proteína aumentando o seu tempo de semivida e a sua biodisponibilidade. Por tudo isto, é importante perceber por um lado como se comportam estes anticorpos nas suas várias associações a quadros de doença, e por outro lado, como se poderão aproveitar estas suas capacidades e plasticidade, tendo em vista potenciais alvos terapêuticos.

### 1.11 Pneumonia e Empiema pleural

A pneumonia é uma forma de infeção respiratória aguda do trato inferior pulmonar que afeta as vias aéreas, alvéolos, tecido conjuntivo, pleura visceral e outras estruturas pulmonares, tornado a respiração um processo doloroso e causando uma limitação na entrada de oxigénio. Os sintomas podem passar por febre, tipicamente com tosse produtiva, dor no peito, sintomas e evidências de envolvimento do parênquima pulmonar, avaliados por exame físico, bem como a presença de infiltrados na radiografia ao tórax (Shah & Sharieff, 2007).

Indivíduos saudáveis podem recuperar de uma pneumonia rapidamente (em 1 a 3 semanas). Porém, indivíduos imunocomprometidos ou com alguma outra comorbilidade relevante, a pneumonia pode dar origem a outras patologias ou mesmo tornar-se fatal (World Health Organization [WHO], 2016). O curso da doença pode depender de fatores como a idade ou o estado de imunossupressão, qualquer que seja a sua origem: nosocomial, adquirida na comunidade ou mesmo causada por agentes atípicos (pneumonia atípica).

No período neonatal os agentes etiológicos mais comuns são os *Streptococcus* do grupo B e bactérias de Gram negativas, transmitidos verticalmente pela mãe. No entanto, em crianças com mais de 3 semanas de vida, a causa mais comum de pneumonia bacteriana é o *Streptococcus pneumoniae*. As pneumonias virais são a principal causa de pneumonias em épocas sazonais sendo o agente mais comum o vírus sincicial respiratório, seguido pelo vírus Influenza. Em crianças em idade escolar (> 5 anos) e adolescentes os microorganismos atípicos *Chlamydia pneumoniae* ou o *Mycoplasma pneumoniae* estão frequentemente associados a pneumonias adquiridas na comunidade existindo também uma elevada prevalência de *Streptococcus pneumoniae* nesta faixa etária (Ostapchuk, Roberts, & Haddy, 2004; Dumke *et al.*, 2015).

As pneumonias são mais graves em crianças com menos de 5 anos de idade e em adultos a partir dos 65 anos. De facto, a principal causa de morte por infeções em crianças menores de cinco anos continua a ser a pneumonia, causando aproximadamente 2.400 mortes por dia. Em 2016, ocorreram cerca de 880.000 mortes em crianças com menos de 2 anos de idade devido a pneumonias, sendo que esta elevada mortalidade está bastante relacionada com fatores socioeconómicos, i.e., populações mais desfavorecidas, mas também relacionada com elementos ambientais, como a poluição atmosférica (United Nations Childrens Fund [UNICEF], 2016).

Derrames ou efusões pleurais são quadros que implicam a existência de líquido na cavidade pleural. Tipicamente, podem ser classificadas como "transudados" ou "exsudados" (Antonangelo L. e Capelozzi V. 2006). Um transudado ocorre quando os fatores mecânicos que influenciam a formação ou a reabsorção do líquido pleural são alterados. Tais acontecimentos podem ser causados por doenças como cirrose hepática, insuficiência cardíaca, hipotireoidismo, neoplasias, hipoproteïnemia, entre outras (Garrido, V. *et al.*, 2006). Pelo contrário, um exsudado resulta de um processo com inflamação ou de outra doença da superfície pleural. Esta condição pode ser causada por pneumonias bacterianas (Figura 5), mas também quadros de tuberculose, distúrbios conjuntivos pulmonares ou alterações malignas da pleura, embolia pulmonar, e síndrome pós-pericardiectomia (Haren, Foudraine, & Gillham, 2007). Uma efusão pleural exsudativa pode ainda ser caracterizada pela presença de derrame parapneumónico, que é uma efusão pleural secundária a pneumonia viral, bacteriana ou abscesso pulmonar (Light, 2006).

Assim, uma pneumonia pode evoluir para um derrame parapneumónico não complicado ou estadio exsudativo. Neste caso, ocorre uma grande afluência de células inflamatórias e citocinas para o espaço pleural, devido ao aumento da permeabilidade microvascular dos capilares, tornando o líquido pleural num produto com maior viscosidade (Alemán *et al.*, 2003; Xirouchaki *et al.*, 2002). Este é um quadro que pode ser resolvido com antibiótico, sem deixar sequelas a nível pleural. Contudo, se este primeiro estadio não for corretamente tratado, então acontecerá evolução para um segundo estadio de derrame parapneumónico complicado ou fibrinopurulento.

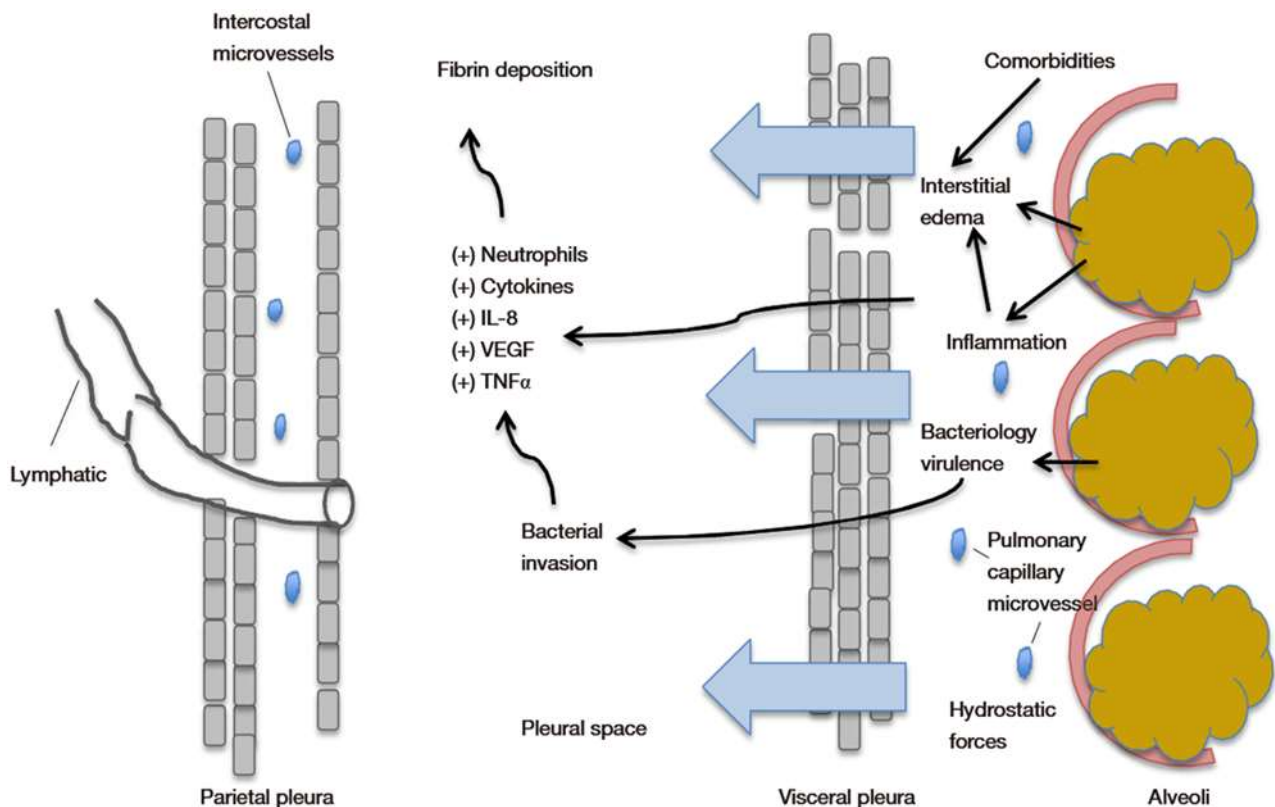


Figura 5 - Esquema representativo dos mecanismos de efusão pleural desenvolvidos durante uma pneumonia bacteriana. Adaptado de McCauley L. e Dean N. (2015).

Neste caso, acontece tipicamente a deposição de fibrinas e de membranas de fibrina no espaço pleural, levando à presença de agregados e formas isoladas de fluído, o que dificulta a extração por toracocentese. Isto acontece porque existe uma invasão do parênquima pulmonar por bactérias, conduzindo a uma resposta imune mais rápida, com maior mobilização de fluídos. Ocorre também uma maior resposta dos neutrófilos e a ativação da cascata de coagulação e consequentemente uma maior deposição de fibrinas. Ora, se o líquido pleural do estadio fibrinopurulento não for drenado ou tratado, então o derrame pode progredir para o estadio organizado ou empiema, em que os fibroblastos invadem a cavidade pleural, formando um líquido espesso e purulento, que pode levar a dificuldade respiratória, aumentando o risco de infeção continuada. Este desenvolvimento pode levar a quadros mais complicados, com níveis de mortalidade entre os 5% e os 30% (Sahn, 2007).

O empiema pleural, piotórax ou pleurite purulenta, apresenta-se então como a acumulação de pús na cavidade pleural, o que raramente se resolve sem terapia ou procedimentos de drenagem apropriados (toracocentese). Nestas situações o hospedeiro terá de alguma forma um comprometimento das suas defesas anatomofisiológicas ao nível do espaço pleural. As características clínicas dependem do órgão primário infetado, do patógeno e dos eventuais defeitos, imunes ou outros, do hospedeiro.

Esta patologia é, contudo, pouco comum. Estima-se que cerca da 0,6% das crianças com pneumonia desenvolvam empiema, que afetará assim aproximadamente 3.3 em cada 100 000 crianças (Hardie W. *et al.*, 1996). No entanto, nas últimas décadas, esta patologia tem vindo a apresentar uma maior incidência (Grijalva, Nuorti, Zhu, & Griffin, 2010; Mahon, Walker, Drage, & Best, 2016; Byington *et al.*, 2009; Finley, Clifton, Fitzgerald, & Yee, 2008), apesar de, com a aplicação da vacina pneumocócica (PCV - *pneumococcal conjugate vaccine*) nos planos de vacinação em alguns países, estas patologias terem vindo a diminuir, de modo especial em doentes pediátricos (Zampoli *et al.*, 2015; Koshy, Murray, Bottle, Sharland, & Saxena, 2010; Díaz-Conradi *et al.*, 2019).

Não existem razões óbvias para o desenvolvimento de empiema, como complicação de pneumonias, em crianças. Muitos destes casos podem estar relacionados com uma maior suscetibilidade dos doentes ou com algum nível de comprometimento imunológico induzido, por exemplo, pela utilização de medicamento instituídos na fase de pré-internamento, como o Ibuprofeno e alguns antibióticos. Há também evidência de que a ocorrência de infeções por vírus varicela zoster num passado recente pode associar-se a estas complicações, como tem sido sugerido em alguns estudos (Elemraid *et al.*, 2014; Byington *et al.*, 2002). No caso de efusões pleurais não parapneumónicas, algumas doenças autoimunes como a AR podem também estar associadas a esta patologia (Cojocaru, Cojocaru, Silosi, & Vrabie, 2011).

Sendo então a pneumonia um evento infeccioso frequente na população pediátrica, com evidência de que não existem diferenças aparentes nas manifestações clínicas em crianças que desenvolvem e que não desenvolvem empiema, e tendo sido descritos quadros de doença pediátrica associada a autoanticorpos anti-citocinas, parece pertinente investigar qual o papel dos autoanticorpos anti citocinas nestes doentes. Em particular, anticorpos anti-IL-1 e anti-IL-6, já que estas citocinas estão intrinsecamente envolvidas na resposta inflamatória, concretamente relevante no contexto de infeções bacterianas. De facto, doentes com défice de IL-1 ou de IL-6, seja por produção deficitária, seja pela presença de anticorpos bloqueadores, são vulneráveis a infeções variadas, normalmente graves, com défices na produção de PCR e com uma resposta inflamatória inadequada.

Aliás, existem já relatos de que estes autoanticorpos possam estar presentes e ter uma função neutralizante em adultos com empiema. Neste contexto, os autoanticorpos condicionarão uma deficiente produção de proteínas de fase aguda (Nanki *et al.*, 2013), sendo uma importante fonte de morbilidade para os doentes, ainda que não existam razões óbvias para o seu desenvolvimento.

Em adultos com doença disseminada a micobactérias não tuberculosas, foi já comprovada a presença de autoanticorpos anti-IFN- $\gamma$ , com efetiva ação neutralizadora sobre a citocina. A sua ação parece ser tão relevante que a terapêutica passa também pela eliminação destes anticorpos circulantes de ação bloqueadora, restaurando a normal função imune (Patel, 2005).

No contexto dos doentes pediátricos em quadro de pneumonia bacteriana, perceber qual o papel dos AACi, poderia ter não só valor científico para a discussão acima referida, mas também vir a funcionar como um importante definidor de práticas clínicas no que toca ao seguimento e terapêutica de doentes com pneumonia, especialmente em idades pediátricas.

Em particular, nos doentes com pneumonia que desenvolvem empiema, a presença de autoanticorpos poderá sugerir uma resposta inflamatória inadequada com o subsequente desenvolvimento de empiema, ou por outro lado, que o excesso de inflamação e citocinas pro-inflamatórias leva à produção de autoanticorpos bloqueadores numa tentativa de limitar o processo inflamatório. Em qualquer dos casos a utilização de imunossuppressores, após o início de antibioterapia, mas antes da instalação do empiema, poderia ter interesse nestes doentes. Não havendo na literatura evidência objetiva desta ocorrência justifica-se um aprofundamento no estudo desta temática.





## 2 Objetivos

Considerando que nos doentes com pneumonia que desenvolvem empiema esta complicação pode ser sinal de uma resposta inflamatória inadequada, uma das causas desta alteração na resposta pode ser a presença de AACi. Por outro lado, existindo nestes doentes o excesso de inflamação e citocinas pro-inflamatórias, esta condição poderá conduzir à produção de AACi bloqueadores, numa tentativa de limitar o processo inflamatório.

Assim, tendo em conta o potencial papel dos AACi em vários contextos de doença, pretendeu-se com este trabalho caracterizar a presença de anticorpos anti-IL-1 e anti-IL-6, e das respetivas citocinas, em doentes com pneumonia, com ou sem desenvolvimento de empiema, e estudar a sua potencial associação com outros elementos clínicos e laboratoriais destes doentes. Para efeitos de avaliação destes autoanticorpos e da sua prevalência nesta população pediátrica, foram ainda incluídos nesta abordagem dois grupos de controlo: crianças saudáveis e em crianças com contexto de doença autoimune, neste caso, Diabetes Mellitus tipo 1.

A identificação precoce da presença de autoanticorpos anti citocinas no soro de doentes em quadro de pneumonia pode ter interesse, por exemplo para o estabelecimento de estratégias supressoras preventivas que possam limitar o risco de desenvolvimento de complicações como o empiema.

Reconhecendo ainda que não se encontram disponíveis no mercado muitas opções validadas para o doseamento de AACi em rotina, apesar de existirem algumas metodologias experimentais descritas, foi também objetivo deste trabalho aplicar e desenvolver metodologias de imunoensaios para a identificação de autoanticorpos, tendo em vista a sua possível aplicação em práticas de rotina no acompanhamento e monitorização de doentes.



### 3 Material e métodos

#### 3.1 População do estudo e recrutamento

Entre Março e Agosto de 2019 foram recolhidas amostras de soro de doentes internados no serviço de Pediatria do Hospital Dona Estefânia-Centro Hospitalar de Lisboa Central (HDE-CHLC), com quadro de pneumonia, independentemente de terem ou não desenvolvimento subsequente de empiema. Incluíram-se no estudo doentes pediátricos (entre 1 mês e 18 anos de idade). Para utilização como grupos de controlo, foram ainda incluídas amostras de soro colhidas a crianças da mesma faixa etária, acompanhadas no mesmo hospital: crianças com Diabetes Mellitus tipo 1, e controlos saudáveis sem doença autoimune e sem quadro de doença infecciosa no momento da colheita.

A todos os representantes legais dos doentes foi entregue um consentimento informado com as informações sobre o projeto, incluindo o seu objetivo e o desenho do estudo. Todos os representantes legais assinaram o respetivo consentimento informado de forma voluntária confirmando a sua livre vontade em participar gratuitamente no estudo. Os participantes foram ainda informados de que seriam recolhidas amostras de sangue periférico, como parte da sua avaliação diagnóstica, bem como algumas informações sobre a história clínica pessoal e familiar, e que poderiam abandonar a sua participação no estudo em qualquer momento, sem qualquer represália para o seu seguimento clínico. Para efeitos de confidencialidade de dados e privacidade do doente, todos os processos e amostras foram codificados, sendo-lhe atribuído um número interno para identificação inequívoca de cada participante, de acesso apenas aos investigadores do projeto.

O conselho de ética aprovou o protocolo de projeto. Ambos os estudos foram submetidos a uma aprovação pela comissão de Ética do Hospital Dona Estefânia-Centro Hospitalar de Lisboa Central (HDE-CHLC) (processo nº 458/2017) e da Comissão de Ética da Nova Medical School|Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (NMS|FCM-UNL) (processo nº 100/2018/CEFCM).

Este estudo foi realizado cumprindo todas as normas de orientação da Declaração de Helsínquia (*World Medical Association*, n.d., 2013).

#### 3.2 Desenho do estudo

Este trabalho foi desenhado como um estudo observacional prospetivo. Cada participante recrutado foi avaliado num único *timepoint*, e foi considerado num dos quatro grupos definidos para o estudo:

- Grupo 1 – Doentes com Pneumonia sem empiema – PSE;
- Grupo 2 – Doentes com Pneumonia com empiema – PCE;
- Grupo 3 – Doentes com Diabetes Mellitus tipo 1 – DMT1;
- Grupo 4 – Controlos saudáveis – CS.

Para cada participante dos grupos 1 e 2 foi colhida uma amostra de soro, como parte da sua avaliação laboratorial de rotina, e foram igualmente recolhidos dados demográficos como a idade e o sexo; dados clínicos relevantes para o presente estudo, tais como outras patologias concomitantes inclusive a presença de doença crónica - considerando todo o tipo de doença que afete o paciente, exceto doenças autoimunes ou do foro respiratório -, história pessoal de infeções ou infeções recorrentes, terapêuticas instituídas e estadio de imunização, e ainda dados laboratoriais, como os níveis de PCR e de Leucócitos, observados no dia da colheita da amostra analisada. Para os participantes dos grupos 3 e 4 apenas se colheu amostra de soro e se procedeu à recolha de dados demográficos gerais (sexo e idade).

Após a colheita, todas amostras foram transportadas até ao laboratório de Imunologia da NMS|FCM, onde foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras foram separadas, procedendo-se à obtenção do soro e às suas alíquotas. Todas alíquotas de soro foram conservadas a -20°C até à sua posterior análise.

Relativamente à faixa etária e aos critérios de inclusão em cada grupo foram considerados os seguintes fatores:

- Grupo 1 – Crianças com idade superior a 1 mês e inferior a 18 anos com diagnóstico de pneumonia sem empiema;
- Grupo 2 – Crianças com idade superior a 1 mês e inferior a 18 anos com diagnóstico de pneumonia com empiema;
- Grupo 3 – Crianças com idade superior a 1 mês e inferior a 18 anos com diagnóstico clínico e serológico de DMT1;
- Grupo 4 – Crianças com idade superior a 1 mês e inferior a 18 anos sem histórico de doença autoimune, alérgica ou infecciosa à data da colheita.

Para efeitos de critérios de inclusão considerou-se ainda para o grupo 1 e 2:

- Presença de pneumonia de presumível etiologia bacteriana (condensação na radiografia de tórax e implementação de antibioterapia à admissão hospitalar)
- Internamento Hospitalar

Como critérios de exclusão para o grupo 1 e 2 foram considerados os seguintes:

- Idade inferior a um mês
- Pneumonia de presumível etiologia viral (sem condensação na radiografia de tórax) e/ou sem implementação de antibioterapia na admissão.
- Existência de imunodeficiência primária ou imunossupressão que condicione a resposta inflamatória

Como critério de exclusão para o Grupo 3 e 4 considerou-se:

- A existência de outra doença autoimune ou infecciosa.

### 3.3 Detecção de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ por ensaios imunoenzimáticos clássicos

A presença de anticorpos em amostras pode ser verificada a partir de um ensaio imunoenzimático indireto - ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Este tipo de imunoensaio enzimático assenta no revestimento de uma microplaca com o antígeno identificado pelo anticorpo que se pretende quantificar. A ligação do anticorpo presente nas amostras é revelada após a adição de um anticorpo secundário, conjugado, que se irá ligar ao anticorpo da amostra capturado na placa. O anticorpo secundário conjugado com uma enzima irá degradar o substrato na proporção do anticorpo capturado, através de uma reacção colorimétrica que pode ser medida num leitor de microplacas.

Para a avaliação dos anticorpos anti citocinas caracterizados neste estudo foram utilizados os Kits comerciais ELISA para pesquisa de autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL-6 Humanos (Cusabio Biotech, Wuhan, China), com avaliação qualitativa. Estando estes ensaios validados e disponíveis no mercado, foram considerados como método de referência, seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante para a sua utilização.

Resumidamente, as microplacas fornecidas encontravam-se já pré-revestidas com IL-1 $\beta$  ou com IL-6. Todos os restantes componentes do kit encontravam-se já prontos para a sua utilização, exceto a solução de lavagem e o conjugado *Horseradish Peroxidase* (HRP) tendo-se procedido primeiramente à sua preparação. A solução de lavagem foi diluída 1:25 em água destilada perfazendo um volume final de 500mL. Por sua vez, o conjugado *Horseradish Peroxidas* (HRP) foi diluído numa concentração de 1:100 em diluente para o conjugado HRP fornecido pelo fabricante com o volume final adequado para o número de teste realizados

Ambos os kits previam uma diluição prévia das amostras com diluente específico para as diluições da mesma, fornecido pelo Kit. Para a IL-6 a diluição das amostras foi de 1:1000, para a IL-1 $\beta$  a diluição das amostras foi de 1:2000. Juntamente com as amostras, os kits forneciam igualmente um controlo Negativo e um controlo Positivo a ensaiar em paralelo.

Após a preparação de reagentes e amostras, o protocolo seguiu-se como se descreve abaixo:

- i. Foram pipetados 100  $\mu$ L do Controlo Negativo, do Controlo Positivo e das amostras previamente diluídas para o respetivo poço da microplaca a testar.
- ii. De seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos.
- iii. Após os 30 minutos de incubação as placas foram lavadas 3 vezes com 200  $\mu$ L da solução de lavagem previamente preparada.
- iv. A cada poço, adicionaram-se de seguida 100  $\mu$ L da solução com o anticorpo anti-IgG humana conjugado com *Horseradish Peroxidase* (HRP), com exceção do poço com o branco da reacção.
- v. As placas foram incubadas novamente a 37°C durante 30 minutos no escuro.
- vi. Após os 30 minutos de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com 200  $\mu$ L da solução de lavagem previamente preparada.
- vii. Adicionaram-se então 90  $\mu$ L do substrato Tetrametilbenzidina (TMB) a cada poço.

- viii. De seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante 20 minutos no escuro.
- ix. Por último, retirou-se a placa da zona de incubação e adicionaram-se 50 µL de solução de Stop.
- x. As absorvâncias dos poços das placas foram lidas de imediato, num leitor de microplacas STAT Fax 2100 (Awareness Technology, Inc.), com filtro de comprimento de onda de 450nm e com um filtro de correção nos 630nm.

Todos os controlos e as amostras foram realizados em duplicado, sendo o valor final a média das duas leituras. Foi utilizado o critério de variação até 10% para a aceitação dos duplicados. Todas as amostras não concordantes foram repetidas.

Para o cálculo dos resultados foi utilizada a fórmula fornecida pelo fabricante comparando as Densidades ótica (DO) das amostras com a DO do controlo negativo:

- $DO \text{ amostra} / DO \text{ Controlo Negativo} < 2.1$ : Amostra Negativa
- $DO \text{ amostra} / DO \text{ Controlo Negativo} \geq 2.1$ : Amostra Positiva

Para que o ensaio fosse validado o controlo Positivo teria que ter valores de razão DO/DO controlo negativo  $\geq 2.1$ .

### 3.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia utilizada para a análise e avaliação de múltiplas características de partículas biológicas, incluindo vários tipos de populações celulares, ou mesmo proteínas ou outros componentes subcelulares. Constituído por 3 componentes distintos (sistema ótico, sistema de fluidos, sistema eletrónico), um citómetro de fluxo pode avaliar um elevado número de células num intervalo de tempo relativamente curto, utilizando por exemplo diferentes marcadores celulares. Atualmente existem vários tipos de citómetros disponíveis, com diferentes lasers, filtros e detetores, que se distribuem ao longo do espectro de luz UV-visível. Neste trabalho foi utilizado o citómetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), que possui 3 lasers podendo medir até 10 parâmetros distintos, com 8 fluorescências disponíveis, compreendidas entre os comprimentos de onda dos 405nm até aos 633nm (BD Biosciences, n.d.).

Resumidamente, esta metodologia implica que a suspensão de células ou partículas seja orientada num fluxo laminar pressurizado, e que intercete assim um ou mais de feixes de luz (laser), a ser emitidos em vários comprimentos de onda. Através do processo de focagem hidrodinâmica, o fluxo de células pressurizado assegura que cada uma das células é focada e avaliada de forma individual na sua passagem pelos lasers.

No momento da interceção da célula, a luz incidente é dispersada e o tamanho e a complexidade da célula vão ser interpretados, a partir da emissão de luz em ângulos de baixo grau ou a 90°, que vão ser respetivamente identificados nos detetores da dispersão de luz frontal e lateral (*Forward Scatter* - FSC e *Side Scatter* – SSC).

Utilizando uma variedade de anticorpos poli ou monoclonais conjugados com fluorocromos, ou outro tipo de marcadores celulares, de superfície ou intracitoplasmáticos, é possível caracterizar especificamente as células, reconhecendo fenótipos, ou por exemplo, avaliar as suas funções celulares. Nos anticorpos monoclonais, utilizam-se as designações definidas nos *Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops* para a codificação dos vários CD (*Cluster de Diferenciação*).

Os citômetros de fluxo são usados para executar tarefas que requerem análises de precisão e alto rendimento. Além disso, desempenham um papel fundamental em hospitais e centros médicos onde são amplamente utilizados para diagnóstico, bem como para protocolos de investigação (Adan A. *et al.*, 2016). Mais recentemente têm vindo a ser desenvolvidas plataformas multiplex para avaliação de proteínas e outras moléculas séricas. O seu uso para medição de proteínas séricas tem sido também muito estudado, sendo a técnica de CBA – *Cytometric Bead Array* uma destas plataformas, amplamente usada para o doseamento de autoanticorpos e citocinas, entre outros (Stelmaszczyk-Emmel, Kopatys, Górka, Głodkowska-Mrówka, & Demkow, 2013; Merkel, Lebo, & Knight, 2019).

### **3.5 Doseamento de Interleucina 6 e 1 $\beta$ Imunoensaio multiplex CBA**

O imunoensaio de BD™ CBA (*Cytometric Bead Array*) *Human Soluble Protein Flex Set System* é uma técnica tradicionalmente utilizada para o doseamento de várias citocinas em simultâneo, em amostras de soro, plasma ou sobrenadantes de culturas celulares. Este ensaio baseia-se na possibilidade de codificar e identificar microesferas através da utilização de intensidades distintas de duas fluorescências, que podem ser posteriormente medidas nos dois canais de fluorescência respetivos num citómetro de fluxo (figura 6). Desta forma, utilizando cada microesfera como plataforma de um imunoensaio distinto, é possível detetar simultaneamente vários analitos numa solução. Assim, neste caso, cada esfera encontrava-se revestida com anticorpos para uma determinada citocina, fornecendo assim uma superfície de captura específica para essa citocina caso se encontrasse presente na amostra. Após incubação com a amostra, os reagentes de deteção, que consistem em soluções de anticorpos anti citocinas conjugados com PE (Ficoeritrina), são adicionados às esferas e fornecerão um sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito que se ligou.

A partir da realização de uma curva padrão com o Standard fornecido em cada kit é possível quantificar os níveis de proteína presentes na amostra.

Para o doseamento de citocinas nas amostras de soro, utilizaram-se os kits BD Flex Set IL-6 e IL-1 $\beta$  e IL-6 (BD™ Biosciences, USA). Todas os reagentes e soluções tampão necessários à realização do protocolo foram os fornecidos no kit complementar *BD Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Master Buffer Kit* (BD Biosciences, USA).



### 3.5.1 Preparação dos *Standards*

Os *Standards* foram fornecidos liofilizados. Para cada *Standard* (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) procedeu-se à sua reconstituição em 15 mL de *Assay Diluent*, o que fez uma concentração inicial de 2500 pg/mL. De seguida realizaram-se diluições seriadas de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256 para obter as diferentes soluções de concentrações conhecidas de IL-6 e IL-1 $\beta$ .

### 3.5.2 Preparação das esferas de captura

Determinou-se o volume das esferas de captura necessário em cada experiência. Por cada amostra ou *Standard* ensaiado estava recomendada a utilização de um volume de 1  $\mu$ L de esferas de captura.

Assim, ao volume necessário de esferas de captura (dependente do número de amostras / *Standards* a ensaiar) adicionaram-se 500  $\mu$ L de solução de lavagem. Procedeu-se a uma centrifugação de 1100 rpm durante 5 minutos. Removeu-se então o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em diluente das esferas de captura para soro/plasma que assegurasse a colocação de 50  $\mu$ L desta mistura em cada amostra / *Standard*.

Exemplo: n=5

- Volume de esferas a lavar: 5  $\mu$ L
- Volume final necessário: 5x50  $\mu$ L de diluente das esferas de captura para soro/plasma = 500  $\mu$ L
- Ressuspensão do *pellet* em 500  $\mu$ L de diluente das esferas de captura para soro/plasma

### 3.5.3 Preparação do reagente de deteção

Determinou-se o volume de reagente de deteção PE necessário em cada experiência. Por cada amostra ou *Standard* ensaiado estava recomendada a utilização de um volume de 1  $\mu$ L de reagente de deteção PE concentrado.

De seguida, calculou-se o volume necessário de diluente para o reagente de deteção considerando que cada amostra requer um volume final de 50  $\mu$ L de reagente de deteção PE.

A solução do reagente de deteção PE foi colocada no frio e protegida da luz solar até à sua utilização.

Exemplo: n=5

- Volume de reagente de deteção PE necessário: 5  $\mu$ L
- Volume final necessário: 5x50  $\mu$ L de diluente = 500  $\mu$ L
- 500 - 5  $\mu$ L do reagente de deteção PE = 450  $\mu$ L
- Diluição do reagente de deteção PE em 450  $\mu$ L de diluente do reagente de deteção

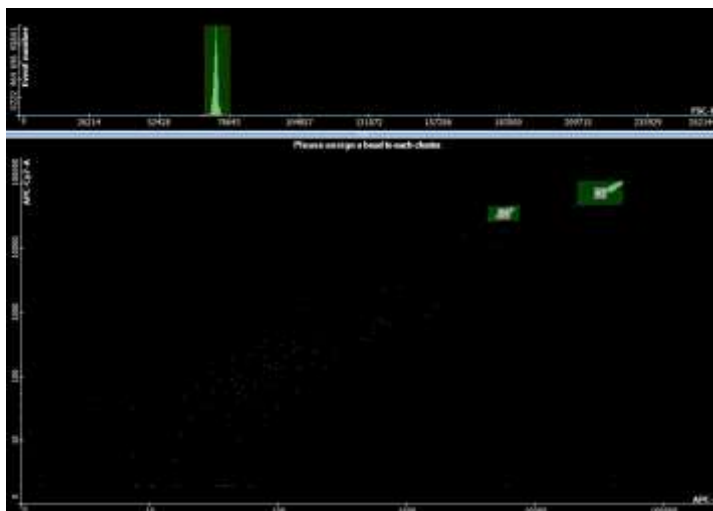
### 3.5.4 Protocolo de ensaio

Após identificar um tubo de citometria por cada amostra ou Standard a ensaiar, foi seguido o protocolo abaixo:

- i. Adicionaram-se 50  $\mu$ L de cada amostra ou Standard no seu respetivo tubo de citometria e juntaram-se 50  $\mu$ L da solução das esferas de captura.
- ii. As amostras foram homogeneizadas por vórtex, e foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro.
- iii. Após a incubação, foram adicionados 50  $\mu$ L do reagente de deteção a cada tubo.
- iv. As amostras foram novamente homogeneizadas por vórtex, e foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente no escuro.
- v. No fim das 2 horas de incubação, adicionou-se 1 mL de solução de lavagem a cada tubo e centrifugou-se a 1100 rpm durante 5 minutos.
- vi. Descartou-se o sobrenadante por decantação e juntaram-se 250  $\mu$ L de solução de lavagem a cada tubo.
- vii. Procedeu-se então à leitura das amostras no citómetro de Fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) adquirindo-se no mínimo 500 eventos por proteína em cada amostra (i.e. 500 esferas por cada analito ensaiado).

### 3.5.5 Estratégia de aquisição e análise

A)



B)

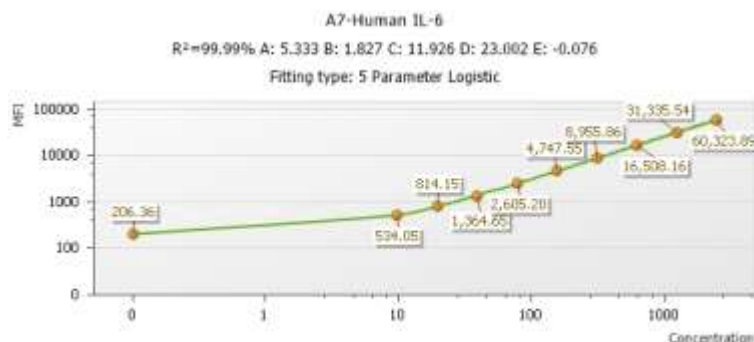


Figura 6 - Estratégia de análise para avaliação quantitativa de citocinas: A) gráfico biparamétrico APCy7-A versus APC-A com o espectro de fluorescência característicos das diferentes *beads*: A7 para a IL-6 e B4 para a IL-1 $\beta$ ; B) exemplo de uma curva de calibração da Intensidade de média de fluorescência (MFI) em função da concentração de IL-6 (pg/mL)

A avaliação quantitativa do nível sérico de citocinas foi realizada tendo por base uma curva padrão com concentrações conhecidas de IL-6 e IL-1 $\beta$  e posterior análise no programa FCAP Array™ Software versão 3.0.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Este software analisa os dados dos Standards e amostras adquiridas no citômetro para encontrar populações de beads por *clusters*. Cada esfera apresenta um espectro de fluorescência dependente de cada tipo de citocina. A ligação do anticorpo conjugado com o PE à citocina leva a uma emissão de fluorescência que pode ser quantificada. Inicialmente foram adquiridos os tubos com o Standard e de seguida as amostras. Identificou-se primeiramente a localização num gráfico biparamétrico APC-Cy7-A versus APC-A das esferas tendo-se identificado de seguida 2 *singlets* em 2 locais distintos no gráfico (Figura 6.A). De modo a selecionar a análise do modelo pretendido definiu-se a posição das *beads* de cada citocina correspondentes para cada *singlet* a partir de uma base de dados presente no programa: A7 para a IL-6 e B4 para IL-1 $\beta$ .

Por fim o programa determina a Intensidade média de Fluorescência (MFI) presente nos *clusters*. A partir da MFI do standard o software calcula uma curva de relação entre a MFI e a concentração de proteína presente (Figura 6.B). Por último é determinada a concentração de IL-6 ou IL-1 $\beta$  a partir da curva padrão de concentrações conhecidas.

### 3.6 Detecção de autoanticorpos por imunoensaio de CBA

Para a avaliação dos autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$  foi desenhada uma técnica modificada a partir do original dos CBA (Figura 7). Esta modificação teve por base uma incubação prévia das esferas com o respetivo top Standard, i.e., com a concentração máxima da respetiva citocina. Só após esta saturação das esferas com as citocinas a considerar na pesquisa de autoanticorpos se procedeu à incubação com as amostras dos doentes, de forma a permitir a ligação do (s) AACi (s) presente (s) na amostra à respetiva citocina do Standard de concentração conhecida.

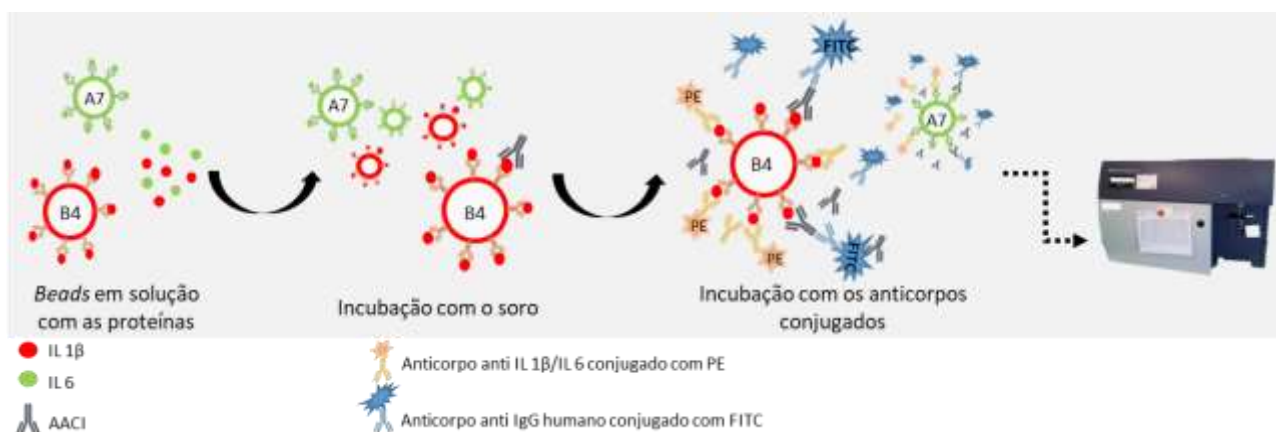


Figura 7 – Esquema representativo do ensaio multiplex CBA para detecção de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$

#### 3.6.1 Preparação dos Standards

Tal como se descreveu acima, os Standards foram fornecidos liofilizados. Para cada Standard (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) procedeu-se à sua reconstituição em 15 mL de Assay Diluent, o que fez uma concentração inicial de 2500 pg/mL. Neste ensaio não foram utilizadas as diluições seriadas, tendo sido incubadas as esferas de captura diretamente com o Standard de concentração máxima, quer para a IL-6, quer para a IL-1 $\beta$ .

#### 3.6.2 Preparação das esferas

Determinou-se o volume das esferas de captura necessário em cada experiência, também como referido anteriormente.

Por cada amostra ou Standard ensaiado estava recomendada a utilização de um volume de 1 µL de esferas de captura.

Assim, ao volume necessário de esferas de captura (dependente do número de amostras /Standards a ensaiar) adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem. Procedeu-se a uma centrifugação de 1100 rpm durante 5 minutos. Removeu-se então o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* num volume diluente das esferas de captura para soro/plasma que assegurasse a colocação de 50 µL desta mistura em cada amostra / Standard.

### 3.6.3 Preparação do reagente de deteção

A preparação do reagente de deteção foi igual ao anteriormente descrito, tendo-se determinado o volume de reagente de deteção PE necessário em cada experiência.

Por cada amostra ou Standard ensaiado estava recomendada a utilização de um volume de 1 µL de reagente de deteção PE concentrado.

De seguida, calculou-se o volume necessário de diluente para o reagente de deteção considerando que cada amostra requer um volume final de 50 µL de reagente de deteção PE.

A solução do reagente de deteção PE foi colocada no frio e protegida da luz solar até à sua utilização.

### 3.6.4 Protocolo de ensaio

Após identificar um tubo de citometria por cada amostra a ensaiar, foi seguido o protocolo abaixo:

- i. Em cada tubo de citometria identificado adicionaram-se 50 µL do Standard de concentração máxima (2500 pg/mL) e 50 µL de solução de esferas de deteção.
- ii. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado por vortex, e as misturas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro.
- iii. De seguida foram adicionados 100 µL de cada amostra ao respetivo tubo.
- iv. O conteúdo de cada tubo foi novamente homogeneizado por vortex, e as misturas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro.
- v. Após esta incubação, adicionou-se 1 mL de solução de lavagem a cada tubo e centrifugou-se a 1100 rpm durante 5 minutos.
- vi. Descartaram-se então os sobrenadantes e adicionaram-se 50 µL do reagente de deteção com PE diluído. Em algumas experiências, foram também acrescentados nesta fase 10 µL de anticorpo policlonal anti- IgG humana marcado com FITC (Daco, Glostrup, Dinamarca).
- vii. O conteúdo de cada tubo foi novamente homogeneizado por vortex, e as misturas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente no escuro.
- viii. Após as 2 horas de incubação, adicionou-se novamente 1 mL de solução de lavagem a cada tubo e centrifugou-se a 1100 rpm durante 5 minutos.

- ix. Por fim, descartou-se o sobrenadante e juntaram-se 250  $\mu$ L de solução de lavagem.
- x. Procedeu-se à leitura no citómetro de Fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) adquirindo-se no mínimo no mínimo 500 eventos por proteína em cada amostra (i.e., 500 esferas por cada analito ensaiado).

### 3.6.5 Estratégia de aquisição e análise

Os dados do ensaio de deteção de autoanticorpos por imunoensaio CBA foram analisados pelo programa Infinicyt™, versão 2.0 (Cytognos, Salamanca, Spain).

De acordo com a distância relativa dos eventos no espaço multidimensional, este software oferece uma variedade de diagramas para representar e interpretar os dados de citometria.

Identificou-se primeiramente a localização num gráfico biparamétrico APC-Cy7-A *versus* APC-A, de 2 *singlets* em 2 locais distintos. Procedeu-se de seguida á realização de um *gate* em cada um dos *singlets* identificando cada *gate* correspondente com o tipo de *bead* e citocina acoplada: A7 para a IL-6 e B4 para IL-1 $\beta$  (Figura 8).

De seguida procedeu-se à análise dos dados das amostras e dos valores correspondentes de MFI do PE e FITC presentes em cada *cluster* de IL-6 e IL-1 $\beta$ .

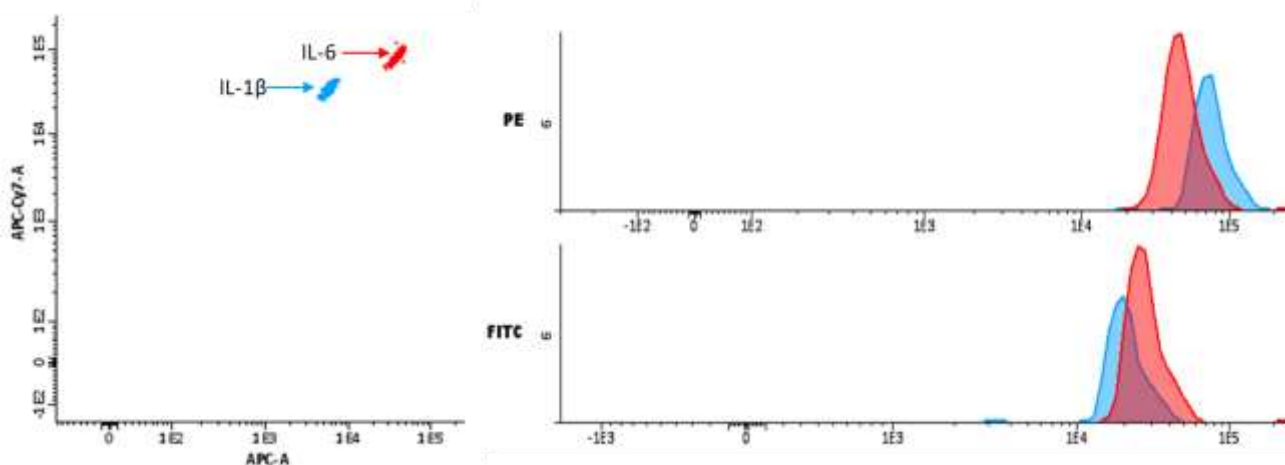


Figura 8 - Estratégia de análise para avaliação semiquantitativa de FITC e PE presente no ensaio Multiplex CBA para deteção de Autoanticorpos anti-IL-6 (espectro A7) e anti-IL-1 $\beta$  (Espectro B4). Os valores encontram-se em escala logarítmica

### 3.7 Equipamentos e software

Todos os ensaios realizados por estratégias multiplex CBA Standard ou modificadas foram adquiridas no citómetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences).

Para a análise e quantificação de IL-6 e IL-1 $\beta$  utilizou-se o programa FCAP Array™ Software versão 3.0.1 (BD Biosciences), tal como referido anteriormente. Para a análise e identificação de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$  pelo ensaio modificado de multiplex CBA foi utilizado o software de análise de dados Infinicyt™, versão 2.0 (Cytognos).

### 3.8 Estatística

A análise estatística foi efetuada com o software pelo GraphPad Prism versão 6.01 para o Windows (GraphPad Software, La Jolla, California). O intervalo de confiança utilizado foi de 95% definindo assim as diferenças estatísticas significativas com  $p < 0,05$ .

Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas os pressupostos de normalidade foram verificados pelo teste Shapiro-Wilk e teste D'Agostino-Pearson omnibus, tendo sido aplicados neste contexto testes não paramétricos, por não se cumprir esta condição.

Assim, para a comparação de variáveis contínuas entre os diferentes grupos foram utilizados testes de comparações múltiplas, em concreto o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Sempre que foram comparados dois grupos apenas, foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

Quanto aos estudos de correlação efetuados, depois de avaliados os pressupostos da normalidade das amostras foi utilizado o teste de Spearman onde não se cumpriram estes pressupostos.

A comparação do método de referência com o novo método de deteção de autoanticorpos por imunoensaio CBA foi realizada com base no cálculo da sensibilidade e especificidade como mostrado na figura 9. Os cálculos foram realizados a partir de uma tabela de contingência onde a sensibilidade e especificidade foram calculadas pela seguinte fórmula:

- Sensibilidade =  $\frac{a}{(a+b)}$  (%)
- Especificidade =  $\frac{d}{(c+d)}$  (%)

		ELISA		
		Positivo	Negativo	
CBA para AACi	Positivo	VP (a)	FP (c)	a + c
	Negativo	FN (b)	VN (d)	b + d
		a + b	c + d	Total

Figura 9 – Representação de uma tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade

VP – Verdadeiros Positivos, FN – Falsos Negativos, FP – Falsos Positivos, VN – Verdadeiros negativos

Para efeitos de validação de métodos foi ainda usado o gratuito ELISA Logit regression V01Jul2018, disponível em <https://ednieuw.home.xs4all.nl>, que permitiu a utilização de modelos de regressão logística com curvas 4PL (4-Parameter Logistic), nas quais o software aplica automaticamente a fórmula:

$$Concentração = \frac{Exp ((logit (resposta)) - intercept)}{slope} \times diluição$$





## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 População do estudo

O estudo incluiu 54 participantes. Assim, foram recrutados um total de 14 doentes com pneumonia, dos quais 7 apresentaram um diagnóstico de pneumonia com formação de empiema e outros 7 foram diagnosticados com Pneumonia apenas, sem complicações pleurais associadas. Foram ainda incluídas 20 amostras de controlos saudáveis e 20 amostras de doentes com DMT1 (Figura 10).

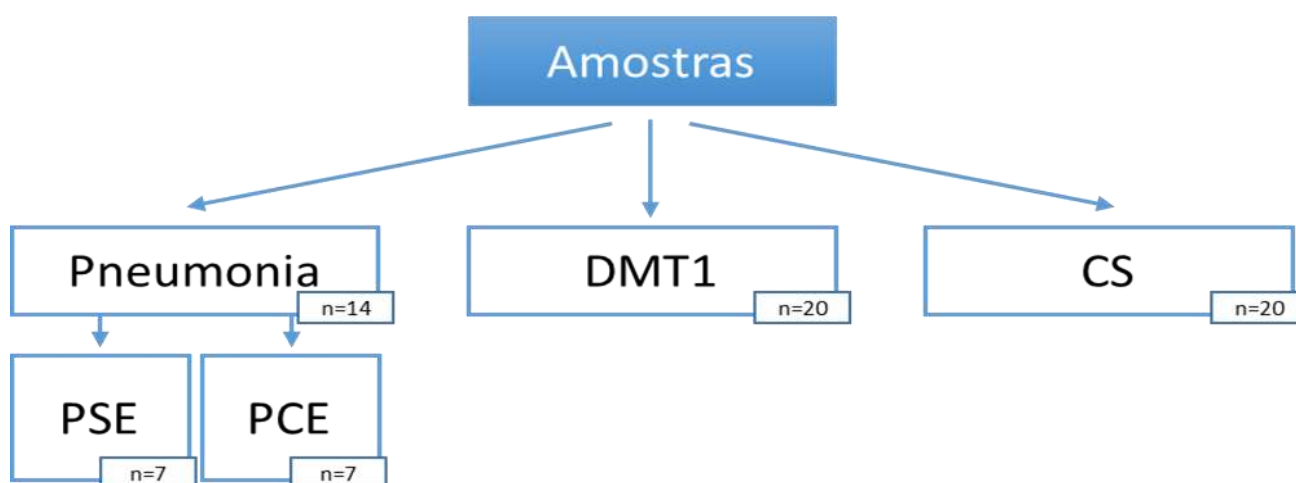


Figura 10 – Representação esquemática do número de indivíduos (n) por amostra das várias populações incluídas no estudo.

PSE - Pneumonia sem empiema, PCE - Pneumonia com empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus do tipo 1, CS - Controlos saudáveis.

O limitado número total de amostras recolhidas nos grupos com pneumonia reflete a dificuldade de obtenção de soro neste estudo. De facto, não se alcançou uma amostra de maiores dimensões, como esperado na construção e planeamento inicial, em virtude de a autorização para o início da recolha das amostras ter acontecido apenas após os períodos de maior ocorrência de pneumonias. Por outro lado, foi possível assumir um número relevante de amostras de doentes com DMT1, mas também de controlos saudáveis, que assim puderam ser tidas em conta como populações de controlo, com e sem base de autoimunidade.

A tabela I sumariza as principais características dos 4 grupos do estudo, no que se refere à abordagem demográfica genérica, mas também a outros elementos clínico-laboratoriais particularmente relevantes para a caracterização e avaliação dos dois subgrupos de doentes com pneumonia, com e sem desenvolvimento de empiema.

Tabela I – Caracterização clínica e demográfica dos grupos das crianças recrutadas

	PSE (n=7)	PCE (n=7)	DMT1 (n=20)	CS (n=20)	p- value
<b>Idade em anos, mediana [Q1-Q3]</b>	9,0 [0,8 – 14,0]	3,0 [2,0 – 6,0]	11,0 [10,0 - 12,0]	11,5 [8,3-12,85]	<b>0,035<sup>a</sup></b>
<b>Sexo, n(%)</b>					
Masculino	5 (71,40)	3 (42,90)	9 (45,00)	10 (50,00)	0,652 <sup>b</sup>
Feminino	2 (28,60)	4 (57,10)	11 (65,00)	10 (50,00)	
<b>Terapêutica instituída, pré-internamento, n(%)</b>					
Com medicação regular	4 (57,10)	2 (28,60)	Não aplicável		0,592 <sup>c</sup>
Sem medicação regular	3 (42,90)	5 (71,40)			
<b>Doença crónica pré-existente, n(%)</b>					
Sim	4 (57,10)	1 (14,30)	Não aplicável		0,265 <sup>c</sup>
Não	3 (42,90)	6 (85,70)			
<b>Vacinação, n(%)</b>					
Com vacina antipneumónica	7 (100,00)	7 (100,00)	Não aplicável		1,000 <sup>c</sup>
Sem vacina antipneumónica	0 (0,00)	0 (0,00)			
<b>Asma, n(%)</b>					
Com asma brônquica	1 (14,30)	2 (28,60)	Não aplicável		1,000 <sup>c</sup>
Sem asma brônquica	6 (85,70)	5 (71,40)			
<b>História pessoal, n(%)</b>					
Com infeções recorrentes	2 (28,60)	2 (28,60)	Não aplicável		1,000 <sup>c</sup>
Sem infeções recorrentes	5 (71,40)	5 (71,40)			
<b>Agente etiológico identificado, n(%)</b>					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	2	Não aplicável		n.a.
Mycoplasma	1	0			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0	1			
Não identificado	6	4			

<sup>a</sup> Teste de Kruskal-Wallis, <sup>b</sup> Teste do Qui-quadrado, <sup>c</sup> Teste exato de Fisher

PSE - Pneumonia sem empiema, PCE - Pneumonia com empiema, DMT1 – Diabetes Mellitus Tipo 1, CS – Controlos Saudáveis, Q1 - 1º Quartil, Q3 - 3º Quartil, n.a. – não aplicável

A partir da observação dos resultados da análise estatística dos dados demográficos (Tabela I), é possível perceber que existem diferenças estatisticamente significativas quando se comparam as idades dos diferentes grupos de doentes incluídos no estudo ( $p=0,035$ ; teste de Kruskal-Wallis). Como seria de esperar, encontramos nos doentes com pneumonia, com e sem empiema, uma tendência para idades mais baixas. Contudo, numa análise mais focada, em que se compararam os diferentes grupos emparelhados dois a dois, observaram-se apenas diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos grupos de doentes com DMT1 e com PCE ( $p=0,038$ ; Teste de comparações múltiplas de Dunn), com os doentes do grupo PCE a evidenciarem idades mais baixas. Também quando comparados com os controlos saudáveis se observou que os doentes do grupo PCE eram tendencialmente mais jovens ( $p=0,063$ ; Teste de comparações múltiplas de Dunn).

De facto, considerando que o grupo de crianças com DMT1 foi recrutado numa fase inicial da doença, percebemos que as faixas etárias encontradas neste grupo estão em concordância com o expectável para a DMT1 na Europa, onde tem uma incidência maior em idades compreendidas entre os 10 a 14 anos (Eurodiab Ace Study Group, 2000). Por sua vez, estudos centrados em populações do norte da Europa relatam que a admissão hospitalar de crianças por pneumonia adquirida na comunidade acontece sobretudo em crianças com idades inferiores a 5 anos (aproximadamente 33 crianças por cada 10000), ou com idades inferiores a 2 anos (42 em cada 10000 crianças admitidas) (Clark, Hammal, Hampton, Spencer, & Parker, 2006; Senstad *et al.*, 2008). Quanto ao sexo, não se encontraram diferenças significativas entre os grupos de participantes recrutados no estudo ( $p=0,652$ ; Teste do Qui-quadrado).

Apesar do número reduzido de participantes nos dois subgrupos de doentes com pneumonia, é possível tecer algumas considerações acerca dos dados clínico-demográficos recolhidos, relevantes na abordagem destes doentes. Assim, podemos apontar desde logo, a inexistência de variações significativas entre doentes com e sem empiema no que se refere ao sexo e à idade dos doentes. Ainda assim, no grupo que desenvolveu empiema, apenas 1 dos 7 doentes tinha mais de 6 anos de idade, sendo que esta distribuição foi mais equilibrada no grupo sem empiema (4 em 7). A aparente tendência para o desenvolvimento de empiema como uma complicação mais frequente em crianças mais jovens poderia ser reforçada com uma maior dimensão de ambos os grupos em estudo.

Por outro lado, parece importante salientar a elevada taxa de vacinação observada, com todos os doentes em quadro de pneumonia a evidenciarem plano de vacinação atualizado à luz do programa nacional de vacinação, incluindo total adesão à vacinação para o Pneumococos. Num estudo que acompanhou crianças com e sem empiema, Grisaru-Soen e colaboradores também não identificaram diferenças para a idade, o sexo ou a presença ou não de vacinação entre os dois grupos de crianças (Grisaru-Soen *et al.*, 2013).

Em Portugal, foi introduzida em 2015 a vacina pneumocócica Pn13 (Prevenar 13®) ou a vacina conjugada antipneumocócica 13-valente (VCP13), de acordo com a Norma da DGS nº 008/2015 (Direção Geral de Saúde [DGS], 2015). Esta vacina veio atualizar as já existentes PCV7 (vacina antipneumocócica 7-valente) e PCV10 (vacina antipneumocócica 10-valente), com mais serotipos de *Streptococcus pneumoniae* representados. Tendo em conta a faixa etária dos doentes recrutados e os *timings* previstos para o início da vacina e dos respetivos reforços, é possível que haja alguma variabilidade entre os doentes no que se refere ao espectro da vacina administrada.

No entanto, ainda que pudéssemos esperar uma menor incidência de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI), neste caso, empiema, em crianças vacinadas, não é possível tirar conclusões a partir dos nossos resultados, uma vez que se verificou que todas as crianças com pneumonia, com e sem empiema, estavam igualmente vacinadas.

Relativamente a outras variáveis, como a existência de outra doença crónica, não alérgica, não se encontraram também diferenças estatisticamente significativas entre crianças com e sem empiema. No entanto, tendo em conta as considerações acima referidas acerca da idade, o facto de se encontrarem

crianças mais jovens entre os doentes do grupo que desenvolveu empiema pode também relacionar-se com a menor presença de outras doenças crónicas nestes doentes, por serem ainda muito jovens. A mesma linha de raciocínio pode aplicar-se à terapêutica instituída previamente ao episódio de pneumonia. Isto é, as crianças do grupo sem empiema evidenciaram maior prevalência de uso de terapêuticas no pré-internamento, o que pode relacionar-se com o facto de serem mais velhas, e de apresentarem maior prevalência de doenças crónicas. Salienta-se, contudo, a importância de confirmar e validar estas observações numa amostra de maior dimensão.

Em particular para a asma, a distribuição de doentes com e sem doença foi semelhante nos dois grupos, rondando os 20%. Curiosamente, Elemraid e colaboradores estudaram o risco de desenvolvimento de empiema, em quadro de pneumonia, num grupo de crianças com asma e num grupo de crianças sem asma. Os autores verificaram não existirem diferenças entre os dois grupos, o que de alguma forma parece estar em linha com as nossas observações neste estudo (Elemraid *et al.*, 2014). No entanto, é importante referir que segundo outros autores, doentes com asma têm risco aumentado para doença pneumocócica (pneumonia, meningite ou septicemia), dependendo da idade e de possíveis malformações congénitas associadas, e podem mesmo ter maior predisposição para o desenvolvimento de doença pneumocócica invasiva, em comparação com doentes sem asma (Shea, Lash, Antonsen, Jick, & Sørensen, 2015; Kwak, Choung, & Park, 2015).

Do ponto de vista da história clínica dos doentes com pneumonia, há ainda a comentar o histórico de infeções recorrentes, para o qual ambos os grupos parecem uma vez mais assemelhar-se. Isto é, em ambos os grupos apenas 28.6% dos doentes evidenciou presença de infeções recorrentes. Uma das causas mais frequente para a ocorrência de infeções recorrentes e/ou persistentes é a presença de algum nível de imunodeficiência no doente, que pode também condicionar o desenvolvimento de doença pneumocócica invasiva (Ingels *et al.*, 2015).

De facto, a pneumonia é uma das doenças respiratórias mais frequentemente associada a crianças com imunodeficiências, neste caso, imunodeficiências primárias (IDP). Dentro das IDP, são mais comumente referidas as deficiências na resposta humoral, com consequente impacto na produção de anticorpos (Mahlaoui *et al.*, 2014). Por outro lado, no caso de doenças autoimunes, uma anormal produção de anticorpos contra o *self* pode também acontecer neste contexto, como é o caso do desenvolvimento de pneumonias intersticiais idiopáticas. Em crianças, esta doença é conhecida como Doença intersticial pulmonar infantil-chILD, apresentando diferentes sintomas daquilo que pode ser observado na doença do adulto (Hime *et al.*, 2015). A chILD é sobretudo uma doença do tecido conjuntivo, em que ocorrem maioritariamente processos inflamatórios crónicos, que podem resultar em fibrose e deformação parenquimatosa. (Fischer *et al.*, 2015). A existência de um número relevante de doentes com histórico de infeções recorrentes pode, portanto, ser mais um elemento a favor da necessidade de conhecer melhor o contexto inflamatório e de produção de autoanticorpos nestes doentes, que podem exatamente associar-se

a uma maior predisposição para infeção, sem que isso se relacione diretamente com um maior risco de complicações como o empiema.

Ao nível de caracterização do agente etiológico nos grupos de PSE e PCE apenas foi possível identificar o agente num dos doentes do grupo PSE, e em 3 dos doentes do grupo PCE. À partida, os quadros clínicos dos doentes sem empiema serão mais leves, permitindo uma abordagem diagnóstica menos exaustiva, o que muitas vezes condiciona a confirmação do agente etiológico. Isto é, o doente acaba por ser tratado de forma empírica, já que frequentemente as hemoculturas são negativas em função, entre outras coisas, da intermitência da bacteremia, e não se justifica um protocolo mais invasivo, com recurso a biópsia. Em todo o caso, a taxa de identificação do agente etiológico foi também baixa no grupo de doentes com PCE. Apesar de a prática assumir para a generalidade destes doentes a drenagem do derrame, com posterior recurso a técnicas de isolamento e identificação do agente, várias limitações surgem a este nível. Por um lado, a quantidade de líquido pleural disponível para a avaliação pode ser limitada, o que condiciona a sua avaliação, quer por métodos clássicos de cultura quer por biologia molecular. Por outro lado, a introdução de antibioterapia prévia é também um fator que limita a realização e a interpretação de resultados dos métodos laboratoriais disponíveis.

Recordando que um empiema é caracterizado pela presença de pus no espaço pleural, que pode evoluir a partir de uma pneumonia bacteriana, pode acrescentar-se que o *Streptococcus pneumoniae* é o agente etiológico mais comum em pneumonias e empiemas adquiridos na comunidade (Krenke, Urbankowska, Urbankowski, Lange, & Kulus, 2016). Dentro das limitações de dimensão dos grupos estudados, esta realidade parece estar de algum modo presente nesta amostra reduzida, em que dos 4 agentes identificados, 2 são efetivamente *Streptococcus pneumoniae*, encontrados exatamente em duas das crianças com empiema.

Além disso, considerando que alguns dos doentes do estudo, sobretudo no grupo PSE, possuem outro tipo de comorbilidade, devemos ter em consideração a presença continuada em ambiente hospitalar e a possibilidade de, conseqüentemente, desenvolverem uma pneumonia de origem nosocomial. Nestes casos, os agentes etiológicos mais comuns seriam bactérias Gram negativas e anaeróbias, que poderiam exigir abordagens terapêuticas, com impacto diferente na evolução do quadro (Maskell *et al.*, 2006). Não se identificando, todavia, diferenças importantes no que se refere aos agentes etiológicos que foi possível caracterizar, ficam apenas estas considerações como pontos de discussão na avaliação dos subgrupos de doentes com pneumonia, com e sem empiema.

Em suma, e considerando todos os elementos anteriormente discutidos, encontramos crianças mais jovens a desenvolver pneumonias com empiema, sobretudo em relação ao grupo de controlo com DMT1, mas também verificamos que na população de doentes com pneumonia estudada neste trabalho não se identificam diferenças evidentes no que se refere às suas características demográficas, nem no que se refere ao respetivo quadro clínico, em função de terem ou não evidenciado desenvolvimento de empiema.

## 4.2 Avaliações laboratoriais de rotina – parâmetros inflamatórios

Para os doentes dos grupos PSE e PCE foi possível proceder à recolha de informação acerca dos parâmetros inflamatórios observados no momento da admissão hospitalar inicial. Os resultados estão apresentados na tabela II.

Tabela II – Parâmetros inflamatórios dos grupos PSE e PCE na admissão hospitalar

	PSE (n=7)	PCE (n=7)	DMT1 (n=20)	CS (n=20)	<i>p-value</i>
<b>Leucócitos /<math>\mu</math>L, mediana [Q1-Q3]</b>					
	13500 [9150 - 19970]	20170 [11600 - 30008]	-	-	0,256 <sup>a</sup>
<b>PCR - Proteína C Reativa (mg/L), mediana [Q1-Q3]</b>					
	140,2 [8,3 - 251,0]	237 [136,2 - 340,8]	-	-	0,198 <sup>a</sup>
<b>Razão Neutrófilos/Linfócitos, mediana [Q1-Q3]</b>					
	2,43 [2,26 - 3,11]	5,53 [4,10 - 9,22]	1,27 [1,01 - 1,60]	1,04 [0,70 - 1,55]	<0,001 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney, <sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis

PSE - Pneumonia sem empiema, PCE - Pneumonia com empiema, DMT1- Diabetes Mellitus tipo 1, CS – Controlos saudáveis, Q1 - 1º Quartil, Q3 - 3º Quartil

A contagem de Leucócitos e o doseamento de Proteína C Reativa (PCR) são parâmetros inflamatórios frequentemente avaliados em crianças admitidas nos hospitais com quadro de pneumonia (Brogan *et al.*, 2012). Contudo, também em relação a estes parâmetros inflamatórios, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de doentes com pneumonia, PSE e PCE. Porém, uma análise mais detalhada da distribuição dos resultados, tal como apresentados nos gráficos A e B da Figura 11, permite mais algumas considerações a este respeito. Assim, e começando pela avaliação dos leucócitos, é possível perceber que a distribuição de valores se apresenta tendencialmente mais elevada nas crianças com pneumonia e empiema, um comportamento que é igualmente observável no que se refere aos níveis séricos do PCR. De facto, estes dados podem, de alguma forma, traduzir o agravamento dos sinais inflamatórios, em consequência do quadro de empiema nestes doentes, o que parece em linha com estudos anteriores. Michelin *et al.*, 2008)

Foi possível avaliar a razão entre a percentagem de neutrófilos e linfócitos circulantes para todos os doentes do estudo, tendo-se verificado que os doentes com pneumonia, PSE e PCE, apresentavam razões significativamente mais elevadas que doentes com DMT1 e CS (PSE vs DMT1,  $p=0,020$ ; PSE vs CS,  $p=0,001$ ; PCE vs DMT1,  $p=0,005$ ; PCE vs CS,  $p<0,001$ , teste de comparações múltiplas de Dunn). Olhando depois em particular para esta razão nos doentes com pneumonia, verificamos que, com exceção de um doente do grupo PCE, todos apresentaram razões superiores a 1,5, denotando como seria de esperar uma predominância de neutrófilos circulantes. Todavia, é notória uma tendência para razões consideravelmente mais elevadas nos doentes que desenvolvem empiema ( $p= 0.093$ , Teste de Mann-Whitney), o que pode eventualmente vir a considerar-se um elemento útil ao diagnóstico, ainda que careça de validação numa amostra de maiores dimensões, que poderá também esclarecer se esta observação é causa ou efeito do quadro clínico mais grave deste grupo de doentes.

Num processo inflamatório normal, são os leucócitos que assumem diversas funções moduladoras, mas que em simultâneo se tornam particularmente sensíveis aos vários sinais metabólicos decorrentes deste processo. Em fases mais precoces da resposta, células como os granulócitos e os monócitos são estimuladas, entre outros fatores, por citocinas como a IL-6 e IL-1 $\beta$ , que promovem a sua produção medular, mas que também acabam por contribuir para o seu recrutamento para os locais de inflamação e infeção. De facto, associamos leucocitoses com aumento de neutrófilos no contexto de infeções bacterianas, por ação direta, local e sistémica, de mediadores imunes que respondem neste contexto. Particularmente em quadros de pneumonia e empiema, Michelin e colaboradores reportaram valores elevados de leucócitos em doentes com pneumonia, com e sem empiema, em relação a controlos saudáveis da mesma faixa etária (Michelin *et al.*, 2008). Num outro estudo, com crianças admitidas no hospital por infeção respiratória pneumocócica, Cardoso e colaboradores observaram que crianças com empiema pneumocócico apresentavam maior frequência de contagens elevadas de leucócitos ( $> 15000$  leucócitos/ $\mu$ L) do que crianças com apenas pneumonia pneumocócica. Ora, os nossos resultados estão de acordo com estas observações do grupo latino-americano, já que também 5 dos 7 doentes do grupo PCE apresentavam valores acima de 15000 leucócitos/ $\mu$ L, e apenas 3 dos doentes do grupo PSE mostraram contagens tão elevadas (Cardoso *et al.*, 2014)



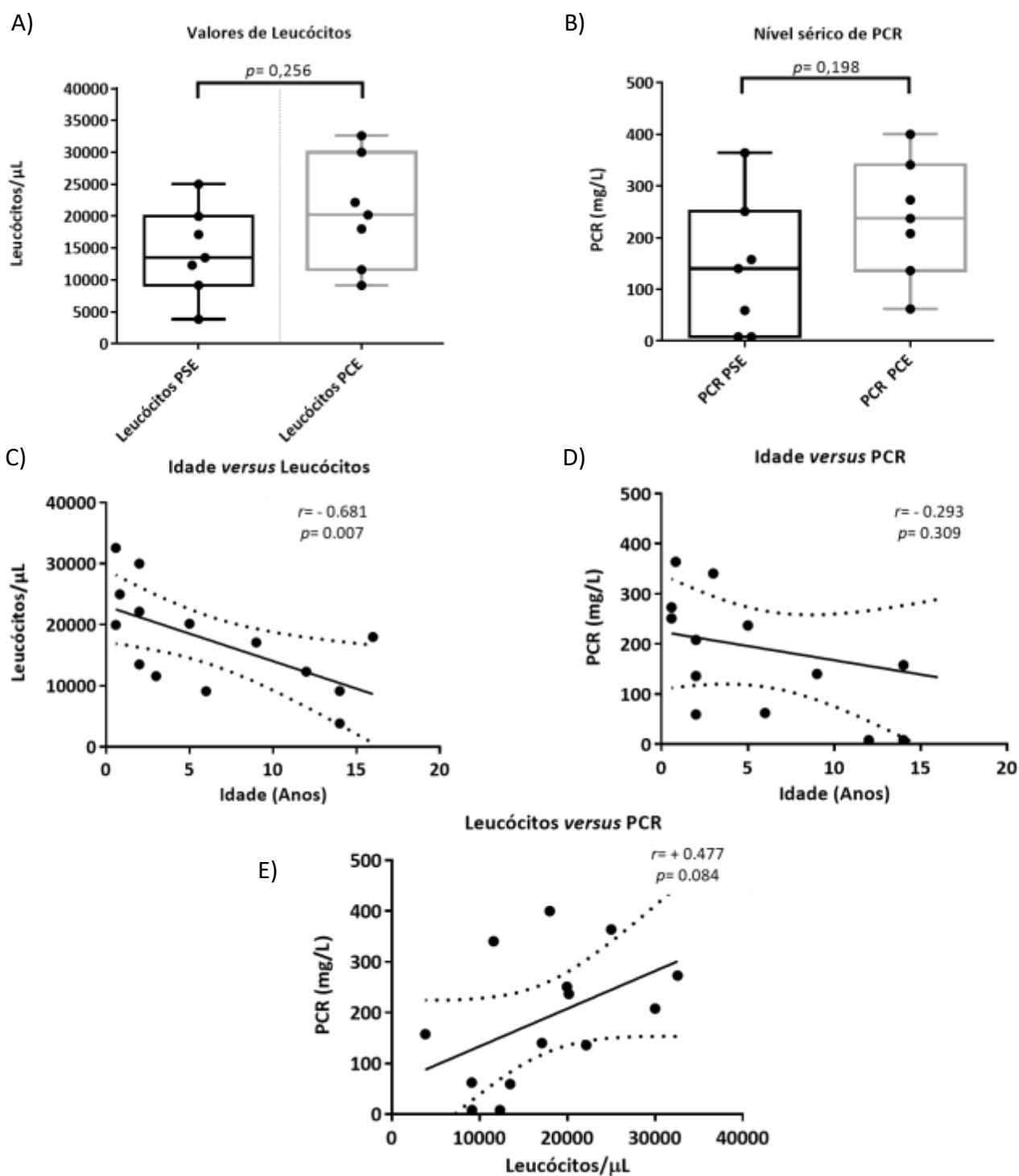


Figura 11 – Comparação dos parâmetros inflamatórios nos grupos PSE e PCE: A) Contagens absolutas de leucócitos (células/mL); B) Níveis séricos de PCR (mg/L); C) Correlação entre idade e contagens absolutas de leucócitos; D) Correlação entre idade e níveis séricos de PCR; E) Correlação entre contagens absolutas de leucócitos e níveis séricos de PCR.

A e B: *Boxplots* representativos das distribuições, assinalando Limite Inferior < 1ºQuartil < Mediana < 3ºQuartil < Limite Superior.

PSE - Pneumonia sem empiema, PCE - Pneumonia com empiema, PCR – Proteína C Reativa

$r$  – Coeficiente de correlação de Spearman,  $p$  -  $p$ -value

Voltando ao estudo de Michelin e colaboradores, em que apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de PCR entre doentes com pneumonia com e sem empiema quando comparados com controlos saudáveis, vemos de alguma forma também aqui alguma sobreposição com os nossos dados, com valores de medianas próximos dos observados nos doentes deste estudo, apesar de o grupo PCE apresentar um valor de mediana consideravelmente superior (Michelin *et al.*, 2008) Ainda que sem significância estatística, este achado pode de algum modo traduzir um quadro inflamatório mais ativo nos doentes com empiema, eventualmente em função de uma maior presença de estimulação por citocinas. Aliás, a PCR é frequentemente usada para monitorizar a resposta dos doentes durante o tratamento de doenças infecciosas, e mais ainda, a manutenção de níveis elevados desta proteína de fase aguda podem associar-se a taxas de mortalidade mais elevadas em doentes com pneumonias adquiridas na comunidade, como demonstraram estudos anteriores (Coelho *et al.*, 2012; Andersen *et al.*, 2016).

Tendo em conta que as populações deste estudo são populações pediátricas, com variações típicas em vários parâmetros imunes em relação, por exemplo, aos padrões para adultos, fomos avaliar neste contexto o impacto da idade nos parâmetros inflamatórios, tal como abordado nos gráficos C e D da figura 11. Assim, verificou-se uma correlação negativa, com significância estatística entre a idade e as contagens absolutas de leucócitos, considerando o total das crianças com pneumonia ( $r = -0,681$ ,  $p = 0,007$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman), e cada um dos subgrupos separadamente, PSE ( $r = -0,919$ ,  $p = 0,005$  teste não paramétrico de correlação de Spearman) e PCE ( $r = -0,811$ ,  $p = 0,030$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman). Ou seja, ainda que o parâmetro inflamatório tenha subido consideravelmente, como é suposto no contexto de infeções bacterianas, há ainda aqui algum impacto da idade neste parâmetro.

Na realidade, as contagens de leucócitos assumem valores mais elevados nos primeiros anos de vida (entre 1 e 3 anos de idade: 6000 - 17000 leucócitos/ $\mu$ L) (Mayo Clinic, n.d.), estabilizando ao longo da infância e adolescência, até aos intervalos de referência reconhecidos no adulto, com valores mais baixos (aproximadamente 3400-9600 leucócitos/ $\mu$ L) (Mayo Clinic, n.d.). Nos doentes do presente estudo, portanto, encontramos também contagens de leucócitos mais elevadas nas crianças mais jovens.

Estudos em populações pediátricas têm também vindo a evidenciar que os níveis séricos de PCR assumem um comportamento semelhante aos dos leucócitos, isto é, em indivíduos mais jovens encontramos intervalos de normalidade com valores mais elevados do que os encontrados em indivíduos mais velhos. Segundo Schlenz e colaboradores, aos dois anos de idade, o percentil 99 atinge 10,2 mg/L de PCR, e encontramos aos 11 anos valores de 6,3 mg/L para o mesmo percentil (Schlenz *et al.*, 2014).

Contudo, e ao contrário do observado para os leucócitos, não se observaram correlações estatisticamente significativas entre a idade e os níveis de PCR nos doentes estudados (doentes com pneumonia:  $r = -0,293$ ,  $p = 0,309$ ; doentes PSE:  $r = -0,627$ ,  $p = 0,137$ ; doentes PCE:  $r = 0,162$ ,  $p = 0,733$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman). Estes dados sugerem, assim, que a variação dos níveis de PCR, tendencialmente mais elevados nos doentes com empiema, esteja exatamente relacionada com outros elementos, que não a idade.

A reforçar ainda esta ideia fica ainda o gráfico E da figura 11, que mostra uma possível associação entre os níveis de PCR e os valores absolutos de leucócitos ( $r = +0,477$ ,  $p = 0,086$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman), apenas visível, contudo na análise de todos os doentes com pneumonia juntos, isto é, a associação não se verifica quando os subgrupos PSE e PCE são considerados separadamente. Tal como acima referido, o quadro mais grave de doença, com contexto pró-inflamatório mais marcado, por exemplo pela presença de citocinas moduladoras, pode ser um dos pontos-chave para os níveis de PCR, ligados ou não à evolução da doença.

### 4.3 Perfil citocínico

A IL-1 $\beta$  e a IL-6 são citocinas pró-inflamatórias que possuem um papel importante em vários contextos de doença. Uma das suas funções, como já foi referido anteriormente, é promover a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. A tabela III sumariza os valores de IL-1 $\beta$  e IL-6 doseados nos doentes com pneumonia, com e sem empiema, e também nos dois grupos de controlo.

Tabela III – Citocinas inflamatórias avaliadas nos grupos PSE, PCE, DMT1 e Controlos Saudáveis

	<b>PSE (n=7)</b>	<b>PCE (n=7)</b>	<b>DMT1 (n=20)</b>	<b>CS (n=20)</b>	<b><i>p-value</i></b>
<b>IL-6 (pg/mL), mediana [Q1-Q3]</b>					
	23,9 [5,8 – 85,6]	14,1 [5,9 – 51,1]	0,0 [0,0 – 120,6]	31,6 [0,0 – 177,5]	0,471 <sup>a</sup>
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL), mediana [Q1-Q3]</b>					
	0,0 [0,0 – 0,6]	0,0 [0,0 – 0,0]	1,1 [0,0 – 31,1]	0,0 [0,0 – 11,5]	0,269 <sup>a</sup>
<b>Razão IL-6/IL-1<math>\beta</math> (pg/mL), mediana [Q1-Q3]</b>					
	41 [6 – 150]	14 [6 – 51]	1 [1 – 7]	1 [1 – 29]	<b>0,003<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> Teste de Kruskal-Wallis

PSE - Pneumonia sem empiema, PCE - Pneumonia com empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis Q1 - 1º Quartil, Q3 - 3º Quartil

Da análise transversal dos diferentes grupos encontramos evidências de que, em todos os grupos, os níveis séricos de IL-1 $\beta$  estão abaixo dos níveis séricos de IL-6. Aliás, como é visível na representação gráfica dos dados da figura 12, entre as amostras ensaiadas, há um grande número onde não é possível detetar níveis séricos de IL-1 $\beta$ , o que está de acordo com a literatura a este respeito, que por outro lado reporta níveis mais elevados de IL-6 (Engel, Kern, Mürdter, & Kern, 1994; Kleiner, Marcuzzi, Zanin, Monasta, & Zauli, 2013).

Ainda assim, do ponto de vista da avaliação estatística dos níveis séricos detetados, quer para a IL-6 (Figura 12.A), quer para a IL-1 $\beta$  (Figura 12.B), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos estudados, mesmo nas comparações múltiplas dos grupos com o teste de Dunn ( $p > 0,05$ ), e também não se identificaram quaisquer associações entre a idade e os níveis séricos das duas citocinas estudadas.

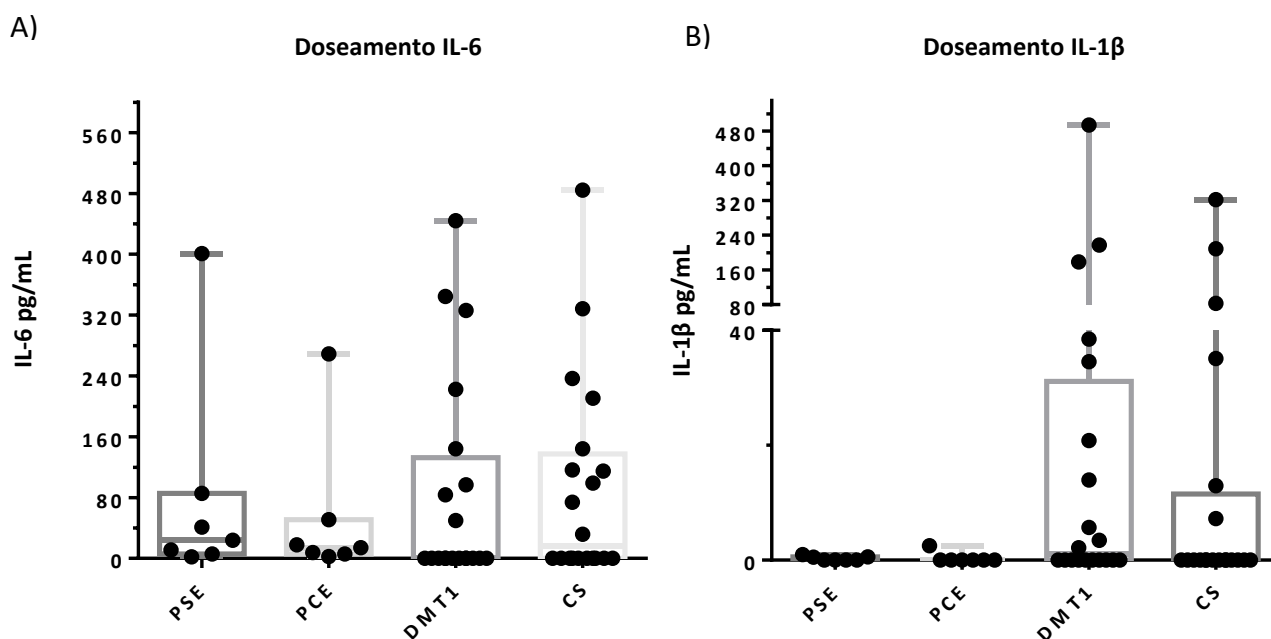


Figura 12 - Doseamento de Interleucinas 6 (A) e Interleucinas 1 $\beta$  (B) utilizando a técnica de CBA.

*Boxplots* representativos das distribuições com Limite inferior <1 $^{\circ}$ Quartil <mediana <3 $^{\circ}$ Quartil <Limite Superior].

PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

Todavia, esta avaliação baseada apenas nos níveis de citocinas séricas acaba por penalizar muito a análise tendo em conta o elevado número de amostras com valores indetetáveis, pelo que se optou por efetuar também a sua avaliação de forma mais direcionada, determinando em cada grupo a prevalência de amostras com valores detetáveis, de modo a aprofundar a abordagem do *milieu* citocínico.

Desta forma, e como pode ver-se na tabela IV, a presença de IL-1 $\beta$  e a presença de IL-6 acontecem de forma diferente entre os grupos, com todos os doentes com pneumonia a evidenciar valores doseáveis de IL-6, uma citocina nem sempre presente quer em doentes com DMT1, quer em controlos saudáveis.

A apresentação distinta acontece com a IL-1 $\beta$ , que parece estar sobretudo diminuída no grupo de doentes com PCE, dos quais apenas um doente apresenta níveis detetáveis da citocina.

Tabela IV – Avaliação qualitativa dos níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$  entre os grupos em estudo

	PSE (n=7)	PCE (n=7)	DMT1 (n=20)	CS (n=20)	<i>p-value</i>
IL-6 n(%)					
Detetável	7 (100,0)	7 (100,0)	8 (40,0)	10 (50,0)	0,004 <sup>a</sup>
Não Detetável	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (60,0)	10 (50,0)	
IL-1β n(%)					
Detetável	3 (42,9)	1 (14,3)	10 (50,0)	6 (30,0)	0,077 <sup>a</sup>
Não Detetável	4 (57,1)	6 (85,7)	10 (50,0)	14 (70,0)	

PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos

Saudáveis

<sup>a</sup> Teste do Qui-Quadrado

Da análise conjunta das concentrações e da avaliação qualitativa podemos, porém, encontrar alguns elementos importantes para a discussão posterior, quando se referirem estas citocinas no contexto da avaliação dos respetivos autoanticorpos. Ou seja, se por um lado verificamos que são sobretudo os grupos de controlo que alcançam valores mais elevados de concentração sérica para a IL-6, a prevalência da citocina parece estar aumentada nos doentes com pneumonias, ainda que estes apresentem valores de concentração mais baixos. Estas diferenças encontradas em relação aos diferentes grupos de controlo podem, entre outras coisas, relacionar-se com a presença de autoanticorpos, que sobretudo podem ser, em diferentes contextos, elementos que promovem um aumento da semivida das citocinas, ou pelo contrário, podem constituir-se como agentes inibidores, mantendo a sua presença, mas limitando a sua ação.

Alguns estudos caso-controlo, e mesmo resultados de metanálise, têm apontado para a presença de níveis séricos de IL-6 mais elevados em doentes com DMT1, comparados com controlos saudáveis (Talaat *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). Tendo em conta o perfil inflamatório da Diabetes, e recordando que todos os doentes avaliados no grupo de DMT1 estavam numa fase de estabelecimento da doença, após o período de lua-de-mel, podemos assumir que estes doentes têm um quadro inflamatório ativo. Contudo, apesar de não observarmos este padrão de aumento de IL-6 nos doentes com DMT1 no presente estudo, há ainda assim um número significativo de doentes com concentrações importantes de IL-6. Seria importante perceber, neste subgrupo de doentes com DMT1 e valores mais elevados de IL-6, se esta condição traduz de algum modo um quadro clínico mais sintomático, ou até se, do ponto de vista celular, há alguma ligação com alguma população em particular. Concretamente, qual o papel que as células Th17 poderiam ter nestes doentes, já que se constituem como uma população intimamente ligada com a IL-6, e para a qual é reconhecido também um papel determinante no desenvolvimento de doenças autoimunes, como é o caso da DMT1 (Hundhausen *et al.*, 2016).

Podemos ainda considerar que o facto não se verificarem diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de IL-6, ou na sua prevalência entre doentes com DMT1 e controlos saudáveis,

subentende a possibilidade de que a citocina estará a ser regulada por mecanismos distintos nos dois grupos de doentes, tais como o restante *milieu* citocínico presente ou a existência de autoanticorpos. Neste caso, a presença destes reguladores poderia atenuar a atividade da citocina, apesar da sua existência em circulação, o que explicaria os níveis observados em controlos saudáveis.

Tipicamente, ocorre na DMT1 destruição das células  $\beta$  do pâncreas, mediada por vários mecanismos, para os quais contribuem fatores ambientais, o background genético, mas também um contexto de infeção, por exemplo viral, que possa condicionar um aumento dos processos inflamatórios neste órgão. Neste último caso, a ocorrência de inflamação local contribui para um aumento das citocinas inflamatórias (Culina, Brezar, & Mallone, 2013). De facto, Gouda e colaboradores, reportaram valores de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  mais elevados em doentes com DMT1 comparativamente com os observados em controlos saudáveis (Gouda, Mageed, Dayem, Ashour & Afify, 2018). Nos grupos do presente estudo, para esta citocina, parece existir não só um aumento dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  nos doentes com DMT1, mas também uma maior prevalência da presença da citocina, sobretudo se comparada com os controlos saudáveis e com os doentes que desenvolvem empiema no seu quadro de pneumonia.

Analizando conjuntamente as observações referentes a IL-6 e IL-1 $\beta$  dos quatro grupos considerados no presente estudo, parece existir uma conjuntura inflamatória diferente em doentes com background autoimune e com inflamação associada a infeção bacteriana. Posto isto, numa tentativa de caracterizar este perfil inflamatório, considerou-se a avaliação da razão IL-6/IL-1 $\beta$  no conjunto dos grupos de doentes e controlos, verificando-se diferenças estatísticas ( $p=0,003$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Realizando de seguida a análise emparelhada onde se compararam os diferentes grupos dois a dois, verificou-se que, de facto, os doentes com DMT1 apresentavam razões IL-6/IL-1 $\beta$  mais baixas que os dois grupos de doentes com pneumonia (DMT1 vs PSE,  $p=0,012$ ; DMT1 vs PCE,  $p=0,034$ ; teste de comparações múltiplas de Dunn) (Tabela III), ainda que as diferenças em relação aos controlos não tenham sido significativas para qualquer dos grupos. Ou seja, num contexto de patologia autoimune a resposta será mais conduzida pela IL-1 $\beta$ , que pelo contrário, será de algum modo ultrapassada pela IL-6 num contexto de infeção.

De acordo com estudos em modelos animais, se por um lado a produção de IL-6 pode ser induzida por vários sinais, incluindo pela IL-1 $\beta$ , também parece ser verdade que a IL-6 induz a produção de PGE<sub>2</sub>, um metabolito que pode, por sua vez, inibir a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 (McGeough *et al.*, 2012) fortalecendo esta ideia de que existem mecanismos de interação e regulação estabelecidos também entre as duas citocinas.

Olhando particularmente para o contexto de infeção respiratória, De Brito e colaboradores reportaram que valores tendencialmente mais elevados de IL-6 aparecem em doentes com pneumonias mais graves no momento do diagnóstico, ainda que no processo de recuperação se observe a descida destes valores quer em doentes com pneumonias graves, quer em doentes com pneumonias mais ligeiras (De Brito *et al.*, 2016). Apesar de não termos verificado esta tendência entre os subgrupos de doentes com pneumonia estudados, que apresentaram níveis comparáveis de ambas as citocinas, fomos avaliar a existência de interações entre os níveis de citocinas e os parâmetros inflamatórios considerados, aparentemente mais

exuberantes nos doentes que se apresentaram com empiema.

Assim, encontramos uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e os valores séricos de PCR quando se analisam todos os doentes com pneumonia ( $r = + 0,640$ ,  $p = 0,014$ , teste não paramétrico de correlação de Spearman). A significância estatística perde-se ligeiramente quando se avaliam em separado os grupos PSE ( $r = + 0,775$ ,  $p = 0,051$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman) e PCE ( $r = + 0,714$ ,  $p = 0,088$ ; teste não paramétrico de correlação de Spearman), mantendo-se ainda assim um valor de  $r$  elevado. Em relação ao valor de leucócitos, parece não estar tão dependente das quantidades de citocinas disponíveis nestes doentes, já que não se correlaciona com qualquer das citocinas estudadas ou com a razão IL-6/IL-1 $\beta$ , que se usou como medidor do perfil inflamatório.

O facto de, ao contrário de outros estudos, não termos verificado aumentos significativos, sobretudo de IL-6 nos doentes de ambos os grupos com pneumonia, pode de algum modo associar-se ainda a fatores como a terapêutica instituída para combater a sintomatologia, previamente à admissão em quadro de pneumonia.

Por fim, há a assinalar que apenas um dos doentes com empiema apresentou níveis detetáveis de IL-1 $\beta$ , sendo exatamente este o doente com valores mais elevados de IL-6 neste grupo. Salienta-se igualmente que é este o doente mais jovem de todo o grupo, com 6 meses de idade à data do diagnóstico, e que evidencia também a maior contagem absoluta de leucócitos. Para além da potencial interferência da idade nestes achados, pode também esta conjugação de valores aumentados associar-se a um quadro mais complexo do ponto de vista clínico, ou até a uma maior virulência do agente, dados de que, todavia, não dispomos para esta discussão. A virulência do microrganismo e o estado geral do hospedeiro, entre outros elementos, podem refletir-se no grau de severidade da infeção, assim como na magnitude dos marcadores biológicos utilizados para a sua monitorização.

Em suma, em relação à população do estudo, podemos apontar comportamentos diferentes para IL-6 e IL-1 $\beta$  entre os grupos, que, não apresentando valores séricos significativamente diferentes, evidenciam, contudo, diferenças na prevalência de valores detetáveis de ambas as citocinas. Assim, a IL-6 é a citocina mais prevalente na generalidade das amostras, aliás presente em todos os doentes com pneumonia, e a IL-1 $\beta$  praticamente indetetável no grupo com pneumonia e empiema, é sobretudo frequente nos doentes com DMT1.

#### **4.4 Autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$**

Várias metodologias têm vindo a ser propostas para avaliar e quantificar a presença de autoanticorpos em amostras de soro, nas mais diversas condições (Puel *et al.*, 2007; Bonfield, Kavuru, & Thomassen, 2002; Barcenás-Morales, Cortes-Acevedo, & Doffinger, 2019). Para usar como método de referência, foram utilizados dois kits comerciais, validados para este efeito, e que avaliam qualitativamente a presença ou ausência de autoanticorpos anti-IL-6 ou anti-IL-1 $\beta$ . Os métodos imunoenzimáticos são simples,

rápidos e amplamente usados em diversas áreas da avaliação imunológica, ainda que particularmente para o estudo de AACi seja muito escassa a disponibilidade de ensaios, sobretudo com pré-validação por parte do fabricante. Os kits usados constituem aliás a única opção comercial disponível no mercado.

Utilizando o valor de *cut-off* recomendado pelo fornecedor, todas as amostras com leituras de DO 2.1 vezes superior à leitura do controlo negativo fornecido pelo kit foram consideradas como amostras positivas para anticorpos anti-IL-6 ou para anticorpos anti-IL-1 $\beta$ . Apresentam-se de seguida os resultados observados em cada grupo (Tabela V), de acordo com esta classificação.

Tabela V – Avaliação da presença de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL1 $\beta$  (n) em PSE, PCE, DMT1 e CS

	PSE (n=7)	PCE (n=7)	DMT1 (n=20)	CS (n=20)	<i>p-value</i>
Anticorpos anti-IL-6					
Positivos	5 (71.4%)	3 (42.9%)	19 (95%)	19 (95%)	0,003 <sup>a</sup>
Negativos	2 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (5%)	1 (5%)	
Anticorpos anti-IL-1β					
Positivos	0 (0%)	0 (0%)	1(5%)	3 (15%)	0,396 <sup>a</sup>
Negativos	7 (100%)	7 (100%)	19 (95%)	17 (85%)	

PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

<sup>a</sup> Teste do Qui-Quadrado

Perante os resultados apresentados na tabela, é possível observar o comportamento díspar para a presença de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ . Na realidade, tal como se observou anteriormente para a citocina, também a prevalência de anticorpos anti-IL-6 parece ser maior que a prevalência de anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , em todos os grupos do estudo.

A literatura é escassa no que se refere a anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , mas os valores observados em controlos saudáveis com a presença anticorpos anti-IL-1 $\alpha$  parecem próximos dos aqui relatados, existindo uma menor prevalência comparando com anticorpos anti-IL-6 (Cappellano *et al.*, 2012; von Stemmann, J. *et al.* 2017). Na verdade, nas amostras ensaiadas a presença de anticorpos anti-IL-1 $\beta$  foi praticamente residual, com apenas 4 das 54 amostras (7%) a mostrarem-se positivas, nenhuma das quais nos grupos com pneumonia, onde os próprios valores séricos de citocina foram igualmente residuais.

Apesar de serem frequentemente descritos como estando aumentados sobretudo em condições de doença (Puel *et al.*, 2007; Takemura *et al.*, 1992), um estudo dinamarquês que avaliou mais de 8000 dadores saudáveis, detetou autoanticorpos anti-IL-6 em cerca de 65% das amostras testadas (von Stemmann *et al.*, 2017). Olhando para os resultados agora apresentados, podemos verificar que estão em linha com estas observações. Por um lado, apresentam-se evidências da presença destes autoanticorpos em crianças com patologia do foro autoimune (DMT1), bem como com complicações infecciosas, como se observa no subgrupo



PSE, mas em simultâneo, verifica-se que estes autoanticorpos se encontram em frequências também significativas em controlos saudáveis. Considerando que em grande parte dos estudos supracitados as avaliações se realizaram em amostras de adultos, talvez a maior prevalência agora observada se deva à faixa etária dos doentes aqui estudados.

Depois de encontrarmos diferença com significância estatística no número de amostras positivas e negativas na avaliação conjunta dos grupos ( $p=0,003$ ; Teste do Qui-quadrado) (Tabela V), realizámos uma análise entre grupos, avaliados 2 a 2, e curiosamente, foi no grupo de doentes com pneumonia e empiema, ou seja, com quadro infeccioso mais complicado, que se encontrou menor presença de anticorpos endógenos anti-IL-6. Assim, encontramos menor prevalência destes autoanticorpos nos doentes do grupo PCE em relação aos controlos saudáveis e aos doentes com DMT1 ( $p= 0,008$ ; Teste de Fisher).

Em todo o caso, não havendo especificamente diferenças significativas entre a prevalência dos AACis anti-IL-6 nos doentes dos grupos PSE e PCE ( $p= 0,592$ ; teste de Fischer), fomos tentar perceber de que forma a presença ou não de autoanticorpos anti-IL-6 em doentes com pneumonia seropositivos e seronegativos correlacionava com as características clínicas e inflamatórias destes doentes. Nenhum dos parâmetros considerado evidenciou diferenças significativas entre os doentes com pneumonia seropositivos e seronegativos para anticorpos anti-IL-6, exceto a razão Neutrófilos/Linfócitos circulantes, como demonstra a tabela VI. De facto, a presença dos autoanticorpos anti-IL-6 nestes doentes poderá assim condicionar a resposta da citocina, promovendo de algum modo a sua função no recrutamento e/ou a diferenciação de neutrófilos.

Segundo defendem Galle e colaboradores, a quantidade de AACis em circulação pode ser determinante. Dizem os autores que a presença de títulos baixos de anticorpos anti-citocinas, concretamente anti-IL-6, não afeta a atividade da citocina, contudo, títulos elevados parecem contribuir para a inibição da citocina, ou mesmo para a sua eliminação por captura em complexos imunes (Galle *et al.*, 2004). Há também autores que defendem que os autoanticorpos anti-IL-6 podem funcionar como transportadores, capazes inclusive de transportar a citocina até órgãos e tecidos-alvo (Knight *et al.*, 2016).

Tabela VI – Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais em doentes com pneumonia com e sem anticorpos anti-IL-6

	<b>Anti-IL-6 Positivos (n=6)</b>	<b>Anti-IL-6 Negativos (n=8)</b>	<b>p-value</b>
<b>Idade em anos, mediana [Q1-Q3]</b>	7,5 [4,3-14,5]	2 [0,6-9,8]	0,085 <sup>a</sup>
<b>Sexo, n(%)</b>			
Masculino	3 (50,00)	5 (62,50)	1,000 <sup>b</sup>
Feminino	3 (50,00)	3 (37,50)	
<b>Terapêutica instituída, pré-internamento, n(%)</b>			
Com medicação regular	3 (50,00)	3 (37,50)	1,000 <sup>b</sup>
Sem medicação regular	3 (50,00)	5 (62,50)	
<b>Doença crónica pré-existente, n(%)</b>			
Sim	4 (66,67)	3 (37,50)	0,592 <sup>b</sup>
Não	2 (33,33)	5 (62,50)	
<b>Vacinação, n(%)</b>			
Com vacina antipneumónica	6 (100,00)	6 (100,00)	1,000 <sup>b</sup>
Sem vacina antipneumónica	0 (0,00)	0 (0,00)	
<b>Asma, n(%)</b>			
Com asma brônquica	2 (33,33)	1 (12,50)	0,539 <sup>b</sup>
Sem asma brônquica	4 (66,67)	7 (87,50)	
<b>História pessoal, n(%)</b>			
Com infeções recorrentes	3 (50,00)	1 (12,50)	0,245 <sup>b</sup>
Sem infeções recorrentes	3 (50,00)	7 (87,50)	
<b>Leucócitos /μL, mediana [Q1-Q3]</b>	17560 [9143 – 20665]	16735 [11780 – 28756]	0,632 <sup>a</sup>
<b>Proteína C Reativa (mg/L), mediana [Q1-Q3]</b>	138,2 [48,7 – 277,8]	229,5 [84,0 – 323,9]	0,514 <sup>a</sup>
<b>Razão Neutrófilos/Linfócitos, mediana [Q1-Q3]</b>	6,38 [4,56 – 9,22]	2,35 [1,97 – 3,11]	<b>0,005<sup>a</sup></b>
<b>IL-6 (pg/mL), mediana [Q1-Q3]</b>	9,5 [5,9 – 26,1]	32,5 [5,5 – 223,2]	0,334 <sup>a</sup>
<b>IL-1β (pg/mL), mediana [Q1-Q3]</b>	0 [0,0 – 1,1]	0 [0,0 – 0,4]	0,720 <sup>a</sup>

Q1 – 1.º Quartil, Q3 – 3.º Quartil

<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney; <sup>b</sup> Teste exato de Fisher

Assim, apesar de o ensaio utilizado ser qualitativo, tentamos igualmente abordar a questão da quantidade de anticorpos a partir dos valores de densidade ótica observados. Foram comparados os doentes dos quatro grupos em função dos valores da razão entre a DO das amostras e a DO do controlo negativo. Os resultados encontram-se nos gráficos da figura 13.

A partir da análise semiquantitativa, considerando as DOs, para os anticorpos anti-IL-6, os quatro grupos evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,005$ ; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 13.A.). Detalhadamente, foram encontradas diferenças com significado estatístico entre as razões de DO dos grupos de controlos saudáveis e de doentes com DMT1 e os doentes com PCE (vs CS,  $p=0,015$ ; vs DMT1,  $p=0,008$ ; Teste de comparações múltiplas de Dunn). De facto, em relação aos anticorpos anti-IL-6, os doentes com PCE apresentaram os níveis mais baixos de razões de DO. Contudo, tal como seria de esperar a partir da análise qualitativa, para os anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , não se verificaram, nos valores das razões de DO, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 13.B). Mais ainda, não se verificaram correlações estatisticamente significativas entre os níveis de autoanticorpos e das respetivas citocinas quando avaliados todos os grupos em conjunto, e quando avaliados em separado os doentes de cada grupo.

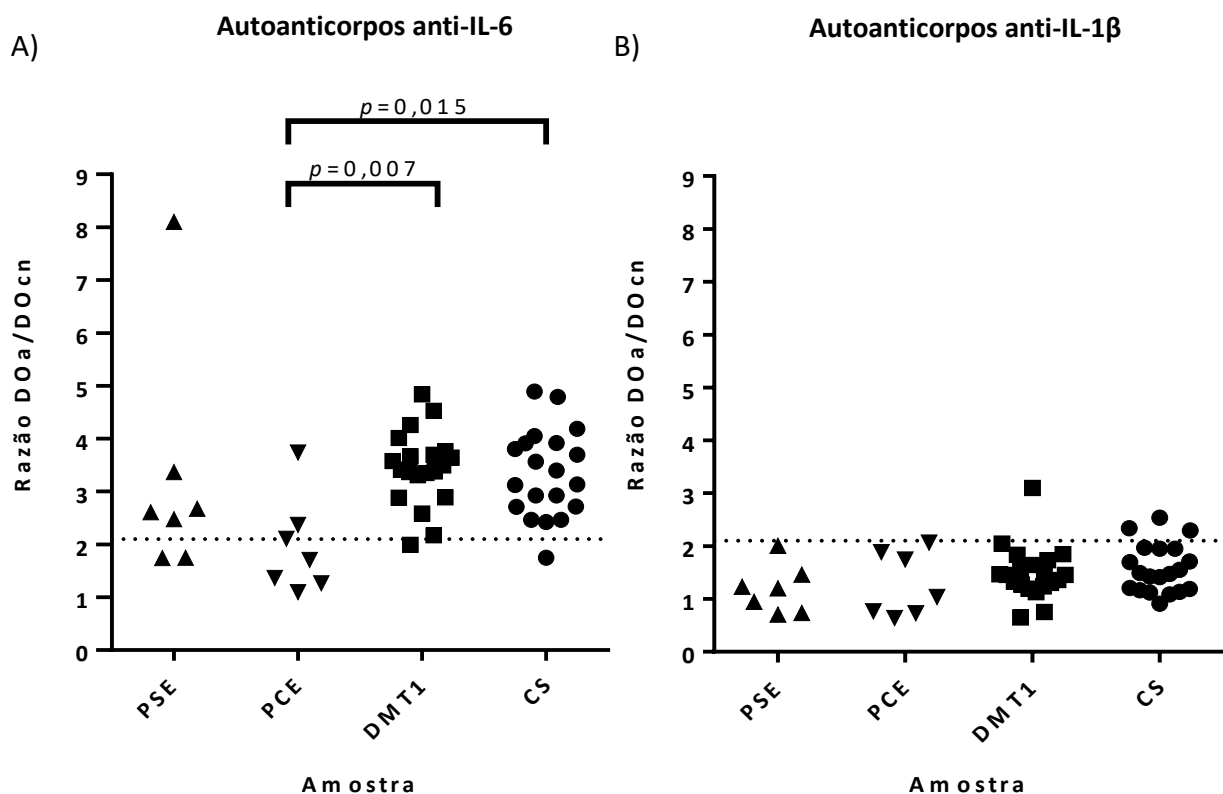


Figura 13 – Comparação entre amostras da presença de autoanticorpos anti-IL-6 (A) e autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$  (B)

DOa - Densidade Ótica da amostra, DOcn - Densidade Ótica do Controlo Negativo, PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

De facto, a coorte dinamarquesa aponta para a presença de títulos elevados de anticorpos em cerca de apenas 1% dos indivíduos saudáveis (von Stemmann *et al.*, 2017). Nos doentes ensaiados no presente estudo, foram sobretudo os grupos DMT1 e controlos saudáveis que evidenciaram títulos mais elevados de anticorpos anti-IL-6. A única exceção foi um dos doentes com pneumonia sem empiema que evidenciou o

título mais elevado de anticorpos, de acordo com a razão de DOs. Numa análise detalhada deste doente, há algumas considerações relevantes a reportar. De facto, dentro do grupo PSE, esta criança possuía o nível mais baixo de Leucócitos (3830 células/ $\mu$ L), ficando bastante aquém das restantes amostras dos doentes com pneumonia, incluindo as do grupo PCE. O valor mais baixo depois deste é já da ordem das 9000 células/ $\mu$ L.

Nanki e colaboradores estudaram a presença de autoanticorpos anti-IL-6 em doentes com infeções invasivas. Um dos doentes, com história de infeções subcutâneas por *Staphylococcus aureus*, evidenciava também valores baixos de leucócitos, tendo em conta o quadro de infeção e os valores de referência para a faixa etária. É interessante perceber que também este doente evidenciou exatamente níveis muito elevados de autoanticorpos anti-IL-6 (Nanki *et al.*, 2013). Tendo em conta que a IL-6 possui uma função importante no recrutamento de neutrófilos e na expressão de moléculas de adesão (De Brito *et al.*, 2016; Chen, *et al.*, 2004), a sua inibição, decorrente da presença de autoanticorpos em larga escala, com ação neutralizante, poderia estar assim relacionada com o baixo número de Leucócitos. Em relação aos outros parâmetros avaliados, porém, não se identificaram características distintivas, nem do ponto de vista clínico, nem do ponto de vista laboratorial, com os valores respetivos a mostrarem-se ao nível das medianas do grupo.

Voltando à questão dos valores elevados encontrados nos controlos e nos doentes com DMT1, um outro elemento que não pode ser descurado, e que eventualmente pode também ter impacto a este nível é o facto de os doentes dos grupos PSE e PCE poderem ter algum condicionamento da sua resposta imune à data da colheita, em função da terapêutica instituída, quer no contexto do combate à infeção em curso, quer no que se refere a medicação associada a outras doenças crónicas pré-existentes, como se identifica na Tabela I (57,1% dos doentes do grupo PSE e 28,6% dos doentes do grupo PCE com indicação de terapêutica instituída e valores similares para a coexistência de doença crónica, 57,1% em PSE e 14,30% em PCE, respetivamente). Estas condicionantes poderiam de facto ser também um fator limitativo da presença de autoanticorpos nos grupos PSE e PCE.

Por fim, não havendo qualquer correlação entre a idade e os títulos de anticorpos anti-IL-6 encontrados, podemos ainda assim ter em conta este fator. A presença de níveis elevados de AACi, potencialmente com capacidade inibitória, foi associada ao aumento da idade, podendo também ser maior ou menor esta presença em homens ou mulheres, de acordo com o tipo de autoanticorpo considerado (von Stemmann *et al.*, 2017). Portanto, a existência de autoanticorpos em idades mais jovens não é tão frequente, o que de alguma forma pode ter condicionado a nossa população, uma vez que é exatamente no grupo PCE que se encontram os indivíduos mais jovens do estudo, e são estes os doentes que evidenciam menor frequência e menores títulos de autoanticorpos anti-IL-6.

Ainda a partir desta abordagem semiquantitativa, e considerando que a quantidade de anticorpos pode de facto ser um elemento importante na sua caracterização e no tipo de funções que possam desempenhar, pareceu-nos relevante olhar para os valores encontrados na população de controlos saudáveis e encontrar a partir daqui um elemento que possa ver a ser considerado no futuro para efeitos de avaliação quantitativa, ou pelo menos, semiquantitativa destes autoanticorpos. Aliás, se valorizarmos as observações

e a apresentação do doente que surge no grupo PSE com razão de DOs mais elevada de toda a população estudada, ou seja, com título de anticorpos anti-IL-6 mais elevado, associado ao nível mais baixo de leucócitos, esta limitação na presença de leucócitos circulantes no doente está também a favor da ação inibidora dos AACis quando presentes em elevadas quantidades, como sugere a literatura anteriormente mencionada. Neste caso, as manifestações no recrutamento de leucócitos podem ser uma ação inibidora diretamente sobre a IL-6 e as suas funções, mas até eventualmente sobre a população de células Th17, envolvida na diferenciação e recrutamento de leucócitos, e também ela dependente da ação da IL-6. Contudo, não havendo manifestações clínicas relevantes, infecciosas ou autoimunes, nos controlos saudáveis, a presença de AACis anti-IL-6 estará em quantidades abaixo deste contexto inibitório.

Assim, em função dos percentis observados para as razões de DO da população de controlos saudáveis, propusemo-nos estabelecer possíveis valores de *cut-off* que pudessem ser aplicados em estratégias futuras, após devida validação (Tabela VII).

Tabela VII – Avaliação da frequência de títulos elevados de anticorpos anti-IL-6, em função da sua presença em controlos saudáveis

Controlos Saudáveis	Razão DO	Frequência de Autoanticorpos Anti-IL-6 em título elevado			
		PSE (n=7)	PCE (n=7)	DMT (n=20)	Todos os grupos
Percentil 50	3,268	28,6% (2/7)	14,3% (1/7)	75,0% (15/20)	52,9% (18/34)
Percentil 75	3,917	14,3% (1/7)	14,3% (1/7)	20,0% (4/20)	17,6% (6/34)
Percentil 90	4,731	14,3% (1/7)	14,3% (1/7)	5,0% (1/20)	8,8% (3/34)
<b>Percentil 99</b>	<b>4,890</b>	<b>14,3% (1/7)</b>	<b>0% (0/7)</b>	<b>0% (0/20)</b>	<b>2,9% (1/34)</b>

PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

Na linha do estudo efetuado em dadores saudáveis dinamarqueses, encontramos frequências comparáveis de títulos elevados de autoanticorpos anti-IL-6, usando de forma semelhante, um critério de *cut-off* da ordem do percentil 99 (von Stemmann *et al.*, 2017). Considerando a perspetiva de continuidade do presente estudo, um dos nossos objetivos futuros é ampliar a amostra ensaiada, enriquecendo-a com participantes de todos os grupos, para fortalecer a eventual aplicação deste valor como marcador.

Por outro lado, seria igualmente importante, no futuro, completar estas observações com um estudo funcional que pudesse comprovar efetivamente as capacidades neutralizantes dos autoanticorpos anti citocinas identificados, à imagem dos que encontramos nos estudos de Puel, Galle e Döffinger (Puel *et al.*, 2007; Galle *et al.*, 2004; Döffinger *et al.*, 2004). Para além desta abordagem seria igualmente importante perceber por outro lado, de que forma concentrações proporcionalmente mais elevadas de AACi poderiam

condicionar de forma mais ou menos significativa a função da citocina que reconhecem. Tal como sugerem Browne e Holland, a presença confirmada de autoanticorpos em indivíduos saudáveis e por outro lado o seu papel patogénico num número crescente de doenças, sugere que a sua presença de forma patológica resulte de um processo de desregulação de mecanismos imunológicos, que poderão condicionar por exemplo um aumento efetivo da sua concentração comum, favorecendo a sua ação inibitória ou neutralizante (Browne & Holland, 2010).

#### **4.5 Autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ – avaliação de métodos de ensaio**

O último objetivo deste trabalho prendia-se com o estudo e a eventual validação de métodos de ensaio para a abordagem de AACi, preferencialmente em estratégias multiplex, que permitam um despiste de vários autoanticorpos em simultâneo. Assim, antes de tudo, procedemos à caracterização da performance dos ensaios imunoenzimáticos clássicos aplicados, dentro das limitações anteriormente apontadas, como a falta de um método de referência, numa tentativa de robustecer também as aproximações semiquantitativas aplicadas neste trabalho. Foi seguido genericamente, e sempre que aplicável, o protocolo seguido por Ata e colaboradores (Ata *et al*, 2014).

Através da avaliação de soros positivos, com diluições sequenciais, procedemos a uma tentativa de caracterização da linearidade dos dois kits usados para a pesquisa de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$ . A linearidade foi avaliada por representação gráfica de densidade ótica por diluição, realizando a curva para os anticorpos anti-IL-6 (figura 14.A) e a curva para anticorpos anti-IL-1 $\beta$  (Figura 14.B), bem como os dados necessários para a obtenção da curva.

Em termos de linearidade, ambos os *kits* evidenciaram algumas limitações, sobretudo no que se refere à avaliação das concentrações mais elevadas, verificando-se ainda assim uma pior performance do ensaio usado na pesquisa de anticorpos anti-IL-1 $\beta$ .

No caso dos anticorpos anti-IL-6, parece haver sobretudo perda de linearidade nas duas diluições mais elevadas, o que de alguma forma indica limitações para a avaliação de amostras com títulos altos. Reavaliando a linearidade do ensaio sem considerar a diluição-mãe, verifica-se uma melhoria dos índices de linearidade, com o  $r^2$  a ascender a 0,926, e mais ainda se ambas as amostras mais concentradas forem eliminadas da avaliação, com valores de  $r^2$  já próximos de 0,972.

Do ponto de vista experimental, e se este método fosse adaptado para uma estratégia de doseamento, ou de avaliação semiquantitativa, amostras com valores de absorvância acima de 0,75 estariam condicionadas a uma diluição sequencial, de forma a poderem ser avaliadas na gama de valores para os quais é mais robusta a linearidade deste método

Uma abordagem similar poderia aplicar-se também aos anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , limitando a utilização da curva para títulos mais elevados. Reavaliando a linearidade do ensaio sem considerar a diluição-mãe, ou ambas as diluições mais elevadas, verifica-se uma melhoria dos índices de linearidade, com o  $r^2$  a ascender respetivamente a 0,755 e 0,930, o que, contudo, fica aquém do esperado para este efeito.

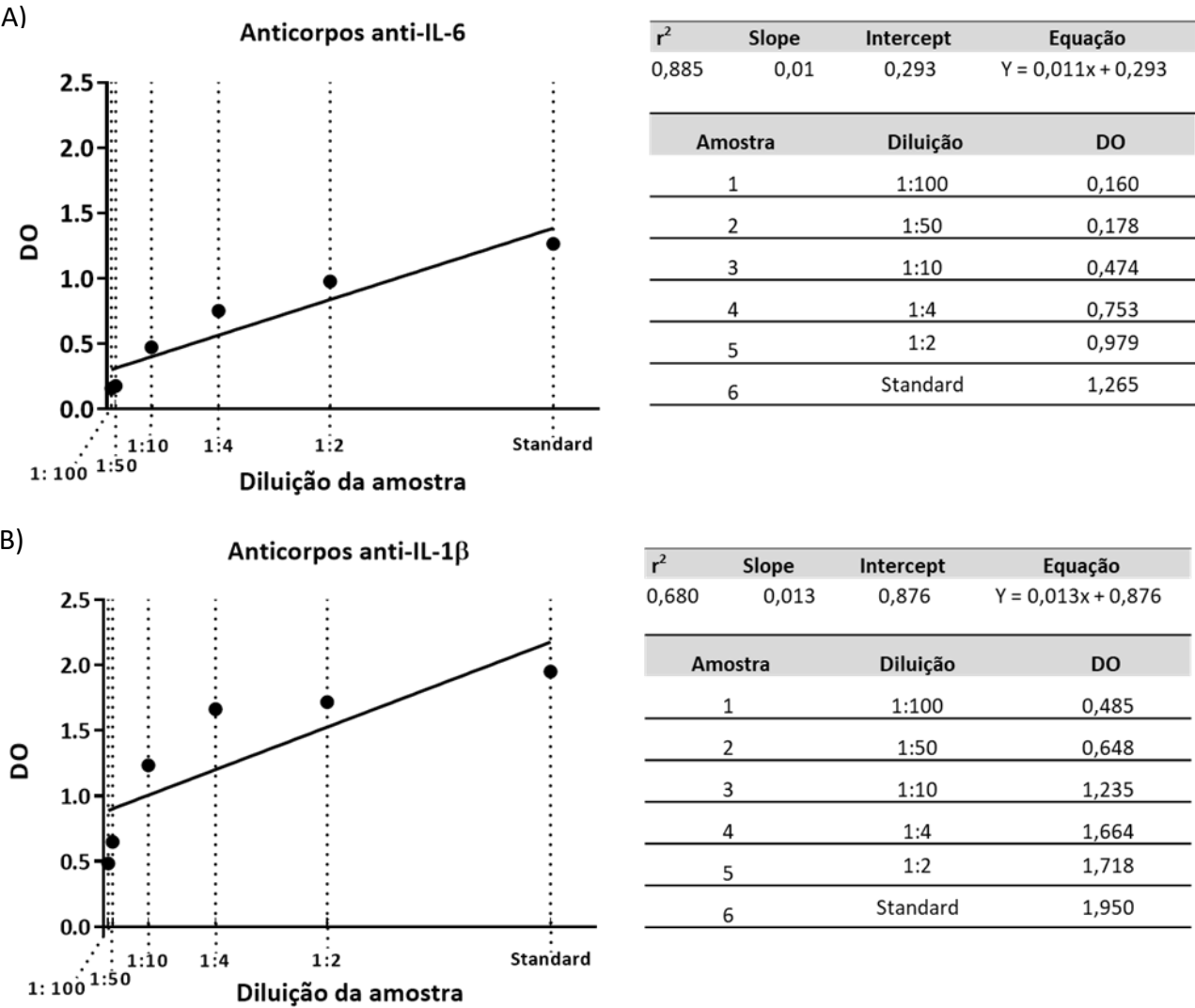


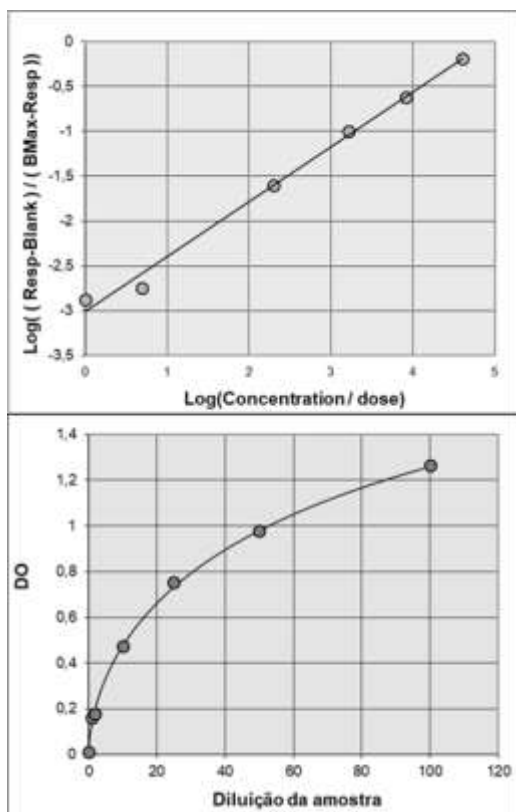
Figura 14 - Verificação da linearidade para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-6 (A) e anti-IL-1 $\beta$  (B).

DO - Densidade ótica

Porém, reconhecendo que tipicamente as curvas padrão dos imunoensaios originam curvas sigmóides (em forma de S), o que é perceptível também olhando para os gráficos apresentados, considerámos neste caso a aplicação dos modelos de regressão logística para a abordagem destas curvas. Neste caso, a modelagem matemática permite o ajuste da curva além do seu intervalo linear. Essa nova faixa é chamada de faixa logística e é mais simplesmente descrita por uma curva 4PL (*4-Parameter Logistic*), com o software ELISA Logit regression V01Jul2018.

Reavaliando assim os dados, obtivemos para os anticorpos anti-IL-6 a avaliação da Figura 15.A e para os anticorpos anti-IL-1 $\beta$  a avaliação da Figura 15.B.

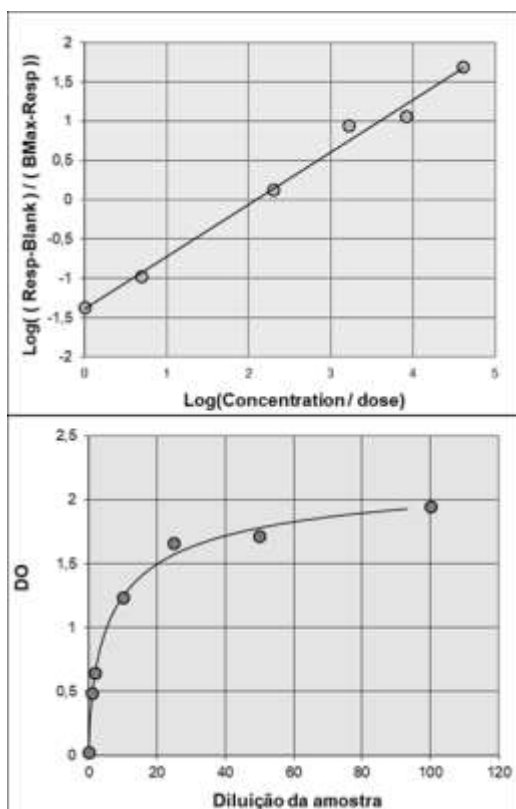
A)



$r^2$	Slope	Intercept
0,9962	0,6089	-3,0203

Amostra	Diluição	DO	Exactidão (<15%) Accuracy
1	1:100	0,1600	1,25%
2	1:50	0,1780	0,76%
3	1:10	0,4740	0,99%
4	1:4	0,7530	1,06%
5	1:2	0,9790	0,99%
6	1:1	1,2650	1,01%

B)



$r^2$	Slope	Intercept
0,9958	0,6651	-1,3881

Amostra	Diluição	DO	Exactidão (<15%) Accuracy
1	1:100	0,4850	1,03%
2	1:50	0,6480	0,93%
3	1:10	1,2350	0,97%
4	1:4	1,6640	1,32%
5	1:2	1,7180	0,79%
6	1:1	1,9500	1,02%

Figura 15 - Verificação da linearidade para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-6 (A) e anti-IL-1β (B) com recurso a regressão logística 4PL.

DO – Densidade ótica.



Com a abordagem da regressão logística verificamos que ambos os métodos apresentam boa correlação entre os seus valores, permitindo a sua potencial aplicação como métodos quantitativos, ou semiquantitativos, desde que pare isso seja possível a inclusão de uma amostra padrão, ou padrão certificado, de concentração conhecida de autoanticorpos, que possa usar-se para efeitos de normalização.

Do ponto de vista da precisão, avaliámos ainda para cada um dos *kits* a precisão intra e interensaio, a partir das amostras de controlo fornecidas no kit. Os valores são apresentados na tabela VIII. Para estes cálculos foram consideradas as orientações para métodos bioanalíticos da *European Medicines Agency*, que para a avaliação da precisão intra e interensaio assume um limite máximo de Coeficiente de Variação de 15%, subindo até 20% para valores baixos, abaixo dos limites de quantificação (*European Medicines Agency*, n.d., 2011). Assim, em termos de repetibilidade (avaliação intraensaio) podemos apontar valores dentro do critério no que se refere às amostras positivas e negativas, cumprindo o critério dos 15% de variação para anticorpos anti-IL-6 e IL-1 $\beta$ . Já em relação à precisão intermédia (avaliação interensaio), verifica-se que em ambos os métodos se alcançam coeficientes de variação inferiores a 15% para as amostras positivas. No entanto, nas amostras negativas, não foi possível cumprir o critério de 15%, apresentando ambos os ensaios CV mais elevados. Apesar da maior variabilidade encontrada na avaliação interensaio, os valores de controlo negativo encontram-se dentro do esperado, resultando desta avaliação conjunta evidência da robustez destes kits no que se refere à precisão.

Na ausência de um método de referência ou de materiais de referência certificados para estes autoanticorpos não foi possível efetuar outras avaliações, como por exemplo a avaliação dos seus índices de sensibilidade e especificidade.

Tabela VIII – Avaliação da Precisão dos kits de imunoensaio enzimático usados na pesquisa de anticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$

Amostra	N	Performance Intraensaio			N	Performance Interensaio		
		Média	SD	CV (%)		Média	SD	CV (%)
Anticorpos anti-IL-6								
Amostra positiva	2	1,265	0,087	6,930	4	1,391	0,195	14,080
Amostra negativa	2	0,082	0,004	4,340	4	0,096	0,034	35,250
Anticorpos anti-IL-1β								
Amostra positiva	2	1,950	0,053	2,720	4	1,774	0,209	11,800
Amostra negativa	2	0,345	0,013	3,690	4	0,276	0,080	29,090

n - número de amostras, SD - Desvio Padrão, CV – Coeficiente de Variação PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

#### 4.6 Imunoensaio CBA para detecção de autoanticorpos

Recentemente, têm vindo a ser descritos vários imunoensaios em plataformas multiplex, desenvolvidos para a identificação e quantificação de AACis, com a vantagem de necessitarem de uma pequena quantidade de amostra, na qual é possível rastrear a presença de vários AACis diferentes, em simultâneo. Contudo, estas metodologias recorrem invariavelmente a plataformas multiplex em sistema fechado Luminex. Dispondo o laboratório de um citómetro de fluxo convencional, onde se encontram já implementadas várias técnicas de doseamento de citocinas também em plataforma multiplex, decidiu-se rentabilizar a sua utilização, e tentar estabelecer assim um ensaio a partir da metodologia de CBA, referida anteriormente.

Assim, na impossibilidade de utilizar neste contexto as esferas da plataforma Luminex mais frequentemente abordadas na literatura (Barcenas-Morales, *et al.*, 2019; von Stemmann, *et al.*, 2017), foi testada a possibilidade de saturar as esferas de quantificação da citocina da plataforma CBA com o calibrador mais alto fornecido no kit. O calibrador de concentração mais elevada foi exatamente utilizado para assegurar um nível máximo de saturação da citocina capturada na esfera. Depois, aplicou-se um protocolo CBA modificado, que teve por base a introdução de uma etapa intermédia antes da introdução do anticorpo secundário: a incubação das esferas com o soro dos doentes, de modo a avaliar a interferência causada por esta incubação na quantificação de citocina da amostra conhecida (*Top Standard*).

Portanto, a presença de autoanticorpos anti-IL-6 ou anti-IL-1 $\beta$  no soro de um doente iria teoricamente promover uma diminuição da leitura da fluorescência do anticorpo secundário (PE – ficoeritrina), quando comparada com uma condição paralela sem incubação com soro do doente (CBA clássico).

Na figura 16 é possível observar os valores de intensidade média de fluorescência (MFI) obtidos para as amostras dos diferentes grupos nos ensaios para pesquisa de AACi.

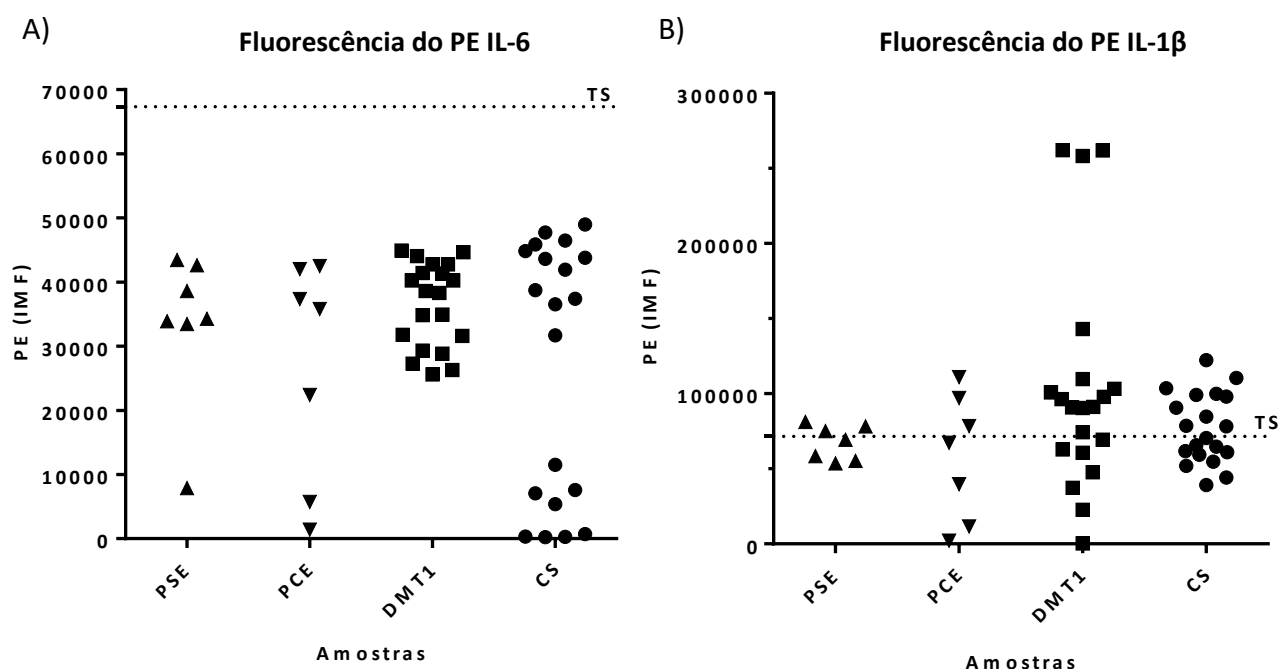


Figura 16 – Comparação da fluorescência do anticorpo secundário (PE- Ficoeritrina) nas amostras com Top Standard de IL-6 (A) e IL-1β (B)

MFI - Intensidade Média de Fluorescência, TS - *Top Standard*, PSE - Pneumonia Sem Empiema, PCE - Pneumonia Com Empiema, DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1, CS - Controlos Saudáveis

Tal como reportamos anteriormente, a presença de autoanticorpos seria avaliada em função da diminuição ou não dos valores de fluorescência obtidos na leitura de fluorescência do anticorpo secundário ligado. Ora, na linha do observado com os ensaios imunoenzimáticos, encontrámos diminuição de MFI (fluorescência PE), em todas as amostras testadas para os anticorpos anti- IL-6 (Figura 16.A). Já para os para os anticorpos anti-IL-1β, o cenário foi diferente, mostrando-se na realidade as amostras com níveis de fluorescência muito próximos do valor do calibrador testado sem qualquer incubação com soro de doentes (Figura 16.B). Em nenhuma das avaliações se observou, contudo, diferença estatisticamente relativa entre os grupos.

Na tentativa de acrescentar especificidade ao ensaio, foi ainda estudada a inclusão de um outro anticorpo secundário, policlonal, anti-IgG humana, marcado com outra fluorescência (FITC – Isotiocinato de Fluoresceína). O racional foi tentar revelar e confirmar que a eventual descida de fluorescência em PE seria proporcional ao aumento da fluorescência em FITC, isto é, à presença de anticorpos IgG humanos ligados à microsfere por reconhecimento da citocina aí capturada (Figura 17).

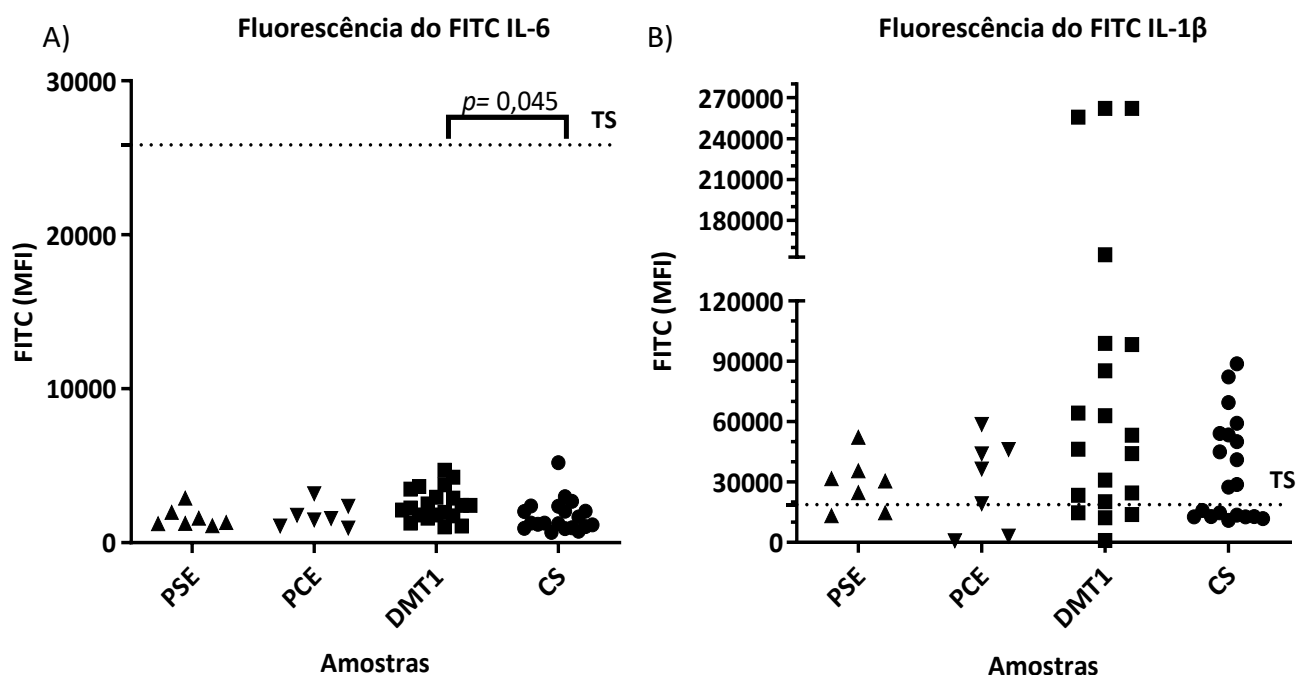


Figura 17 – Comparação da fluorescência do anticorpo secundário anti-IgG humana (FITC- Isotiocinato de Fluoresceína) nas amostras com Top Standard de IL-6 (A) e IL-1β (B)

MFI - Intensidade Média de Fluorescência, TS - *Top Standard*, PSE - *Pneumonia Sem Empiema*, PCE - *Pneumonia Com Empiema*, DMT1 - *Diabetes Mellitus Tipo 1*, CS - *Controlos Saudáveis*

Percebemos aqui, da análise dos gráficos das fluorescências de FITC que também o desempenho dos autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1-β foi distinto. Praticamente não se verificaram subidas na fluorescência relativamente aos autoanticorpos anti-IL-6 (Figura 17.A), mas pelo contrário houve subidas mais marcadas nos valores de fluorescência específica na avaliação dos autoanticorpos anti-IL-1β (Fura 17.B). No entanto, nas comparações entre os grupos apenas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os autoanticorpos anti-IL-6 entre as amostras de Controlos Saudáveis e de DMT1 ( $p=0,045$ ; Teste de comparações múltiplas de Dunn). O grupo DMT1 evidenciou leituras de fluorescência em FITC mais elevadas, isto é, possivelmente com mais autoanticorpos anti-IL-6 IgG que os controlos saudáveis.

Contudo, o desempenho de qualquer dos métodos não atingiu, do ponto de vista da *performance*, os critérios desejados. Desde logo, não se verificaram correlações estatisticamente significativas, relevantes, entre os valores de intensidade média de fluorescência de FITC e de PE, em nenhum dos ensaios. Claro que as diferenças observadas na fluorescência do anticorpo anti-IgG (FITC) podem também ser efeito da presença de diferentes isótipos de anticorpos presentes, que condicionem a forma desconcertada como se orientam as leituras emparelhadas. Ainda assim, era expectável e desejável até que tivesse sido demonstrado algum nível de correlação entre estes parâmetros.

Não havendo boa correlação com as duas fluorescências, fomos então considerar que forma poderiam estas relacionar-se, ou não, com as densidades óticas obtidas para as respectivas amostras no ensaio imunoenzimático, mas também aqui não se encontraram resultados muito animadores. Em nenhum dos ensaios se verificou correlação estatisticamente significativa entre as DOs do ensaio imunoenzimático e as duas fluorescências avaliadas no ensaio CBA modificado.

Por último, considerando que a fluorescência do anticorpo secundário, PE, teoricamente, iria diminuir em função dos autoanticorpos presentes na amostra, e assumindo a falta de significância na avaliação das correlações, tentou estabelecer-se então uma avaliação qualitativa dos resultados obtidos no CBA modificado, por aplicação de um *cut-off* de positividade. Para isso foram feitas curvas ROC (Curva Característica de Operação do Receptor), onde se consideraram os valores de MFI de PE em função da positividade do ensaio imunoenzimático para cada anticorpo anti-citocina testado.

Assim, considerando um *cut-off* de 37362 de MFI de PE, abaixo do qual as amostras seriam consideradas positivas, foi possível avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio modificado de CBA para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-6, por comparação com o ensaio imunoenzimático, como se mostra na tabela IX.

Tabela IX – Avaliação de sensibilidade e especificidade para o ensaio CBA modificado para anticorpos anti-IL-6, usando como valor de *cut-off* de positividade, a MFI do percentil 75 dos controlos saudáveis

		ELISA AACi Anti-IL-6		
		Positivo	Negativo	
CBA para AACi Anti-IL-6	Positivo	24	3	27
	Negativo	22	5	27
		46	8	54

A aplicação destes critérios permitiu chegar a valores de sensibilidade de 52,17% [Intervalo de Confiança 95%: 36,95 – 67,11], especificidade de 62,50% [Intervalo de Confiança 95%: 24,49 – 91,48], Valor Preditivo Positivo de 88,89% [Intervalo de Confiança 95%: 70,84 – 97,65], e Valor Preditivo Negativo de 18,52% [Intervalo de Confiança 95%: 6,30 – 38,08].

Aplicando de igual forma um *cut-off* de 82951 de MFI de PE, abaixo do qual as amostras seriam consideradas positivas, foi possível avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio modificado de CBA para a avaliação de autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$ , por comparação com o ensaio imunoenzimático, como se mostra na tabela X.

Tabela X – Avaliação de sensibilidade e especificidade para o ensaio CBA modificado para anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , usando como valor de *cut-off* de positividade, a MFI do percentil 75 dos controlos saudáveis

		ELISA AACi Anti-IL-1 $\beta$		
		Positivo	Negativo	
CBA para AACi Anti-IL-1 $\beta$	Positivo	1	19	20
	Negativo	3	31	34
		4	50	54

A aplicação destes critérios permitiu chegar a valores de sensibilidade de 25,00% [Intervalo de Confiança 95%: 0,63 – 80,59], especificidade de 62,00% [Intervalo de Confiança 95%: 47,18 – 75,35], Valor Preditivo Positivo de 5,00% [Intervalo de Confiança 95%: 0,13 – 24,87], e Valor Preditivo Negativo de 91,18% [Intervalo de Confiança 95%: 76,32 – 98,14].

Os resultados da avaliação dos ensaios CBA modificados quer para IL-6 quer para IL-1 $\beta$  não são satisfatórios para uma implementação em rotina, assinalando-se assim que carecem ainda de mais algumas etapas de otimização, para que possam alcançar níveis de performance que os coloquem, pelo menos num nível aceitável na sua comparação o ensaio imunoenzimático clássico. A adaptação da plataforma CBA parece, para já, não ser uma alternativa robusta, sobretudo para a pesquisa de autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$ , presentes em menores concentrações e com menor prevalência. Para os anticorpos anti-IL-6, o desempenho não é igualmente satisfatório, apesar de se mostrar com índices de sensibilidade e especificidade melhores.



## 5 Conclusões

Em suma, e considerando todos os elementos anteriormente discutidos, encontramos crianças mais jovens a desenvolver pneumonias com empiema, sobretudo em relação ao grupo de controlo e com DMT1, mas também verificamos que na população de doentes com pneumonia estudada neste trabalho não se identificam diferenças evidentes no que se refere às suas características demográficas, nem no que se refere ao respetivo quadro clínico, em função de terem ou não evidenciado desenvolvimento de empiema.

Dentro dos grupos de doentes com pneumonia, com PSE e PCE, sem variações significativas entre si nos parâmetros inflamatórios, verifica-se algum impacto da idade nos valores de leucócitos. Contudo, um quadro de doença mais grave, eventualmente de contexto pró-inflamatório mais marcado pelas citocinas moduladoras, pode representar um dos pontos-chave para os níveis de PCR tendencialmente mais elevados em doentes com empiema.

Analisando conjuntamente as observações referentes a IL-6 e IL-1 $\beta$  dos quatro grupos considerados no presente estudo, parece existir uma conjuntura inflamatória diferente em doentes com background autoimune e com inflamação associada a infeção bacteriana. Apesar de os níveis séricos não apresentarem diferenças entre os grupos do estudo, evidenciaram-se, contudo, diferenças na prevalência de níveis séricos detetáveis de IL-6 e IL-1 $\beta$ : a IL-6 é a citocina mais prevalente na população do estudo e está presente em todos os doentes com pneumonia, e a IL-1 $\beta$  é praticamente indetetável no grupo com pneumonia e empiema, sendo sobretudo frequente nos doentes com DMT1. Ou seja, num contexto de patologia autoimune a resposta será mais conduzida pela IL-1 $\beta$ , que pelo contrário, será de algum modo ultrapassada pela IL-6 num contexto de infeção.

À imagem do observado para a respetiva citocina, também a presença de autoanticorpos anti-IL-1 $\beta$  foi residual na população do estudo. Todavia, para os autoanticorpos anti-IL-6, foi no grupo de doentes com pneumonia com empiema, ou seja, com quadro infeccioso mais complicado, que se encontrou menor concentração e menor prevalência destes anticorpos endógenos. Contudo, se por um lado, a presença de autoanticorpos anti-IL-6 poderia apontar para uma ação protetora, ao estarem presentes em títulos aparentemente baixos na população de controlos saudáveis, o doente com valores mais elevados de anticorpos anti-IL-6 observado no grupo com pneumonia, pode ser um elemento a favor das suas funções neutralizantes, visto existirem elementos distintivos neste caso, como uma diminuição do número de leucócitos circulantes. Ou seja, como conclusão, podemos apontar a necessidade de continuar este estudo, de forma a podermos esclarecer de que forma as duas citocinas, entre outras, são reguladas pelos respetivos autoanticorpos.





## 6 Perspetivas Futuras

Existe ainda um longo caminho a percorrer no estudo da presença de autoanticorpos anti-IL-6 e anti-IL-1 $\beta$  em crianças com pneumonia com empiema. Para além de ser nossa intenção aumentar o número de participantes avaliados nesta coorte, sobretudo nos grupos com pneumonia, pretendemos também estender esta avaliação a outros autoanticorpos, e sobretudo reforçar a avaliação funcional destes reguladores. Assim, e à imagem do que já tem vindo a ser feito, pretendemos avaliar os níveis séricos, efetivamente, considerando inclusive uma abordagem longitudinal dos doentes, para que se possam identificar eventuais oscilações nas concentrações séricas. Uma vez que pensamos que as concentrações de AACi possam ter impacto na sua função inibidora ou protetora, a abordagem complementar de títulos e estudos funcionais ao longo do tempo parecem ser um elemento importante na procura dos mecanismos de regulação associados.

Relativamente à utilização dos imunoensaios enzimáticos para pesquisa de autoanticorpos anti-citocinas, pretendemos igualmente completar a validação dos ensaios comerciais já existentes, sobretudo no que se refere à sua eventual aplicação quantitativa ou semiquantitativa. De facto, uma estratégia estandardizada, reprodutível e validada para avaliações quantitativas continua a ser uma demanda para clínicos e doentes que convivem com patologias deste foro, que continuam a precisar de uma metodologia precisa e robusta para implementar na sua avaliação serológica.

Quanto aos ensaios multiplex, a ideia de ter ensaios com várias funcionalidades, em simultâneo, continua a ser de grande importância, rentabilizando amostra, tempo e recursos para avaliar um maior número de parâmetros. Seria de facto uma alternativa válida para uma abordagem mais complexa e complementar de doentes, porém, será necessário ainda um grande investimento técnico em relação à estratégia aqui delineada, que, contudo, poderá vir a ser uma mais-valia, por exemplo na capacidade de quantificar, mas também diferenciar isótipos destes anticorpos.



## 7 Referências Bibliográficas

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 Forms an IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity*, 20(3), 319-325.
- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Cramer, R., Duan, S., Eiwegge, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna P2, Kovacs, N., Kucukseze, U., Meyer, N., Morita, H., Olzhausen, J., O'Mahony, L., Pezer, M., Prati, M., Rebane, A., Rhyner, C., Rinaldi, A., Sokolowska, M., Stanic, B., Sugita, K., Treis, A., van de Veen, W., Wanke, K., Wawrzyniak, M., Wawrzyniak, P., Wirz, O. F., Zakzuk, J. S., & Akdis, C. A. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 984-1010.
- Alemán, C., Alegre, J., Monasterio, J., Segura, R. M., Armadans, L., Anglés, A., Tabin, R., Gervais, A., & Sevilla, T. F. (2003). Association between inflammatory mediators and the fibrinolysis system in infectious pleural effusions. *Clinical Science*, 105(5), 601-607.
- Al-Hakeim, H. K., Al-Rammahi, D. A., & Al-Dujaili, A. H. (2015). IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNF $\alpha$  proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. *Journal of Affective Disorders*, 182, 106-114.
- Alten, R., Gram, H., Joosten, L. A., Berg, W., Sieper, J., Wassenberg, S., Burmester, G., van Riel, P., Diaz-Lorente, M., Bruin, G. J., Woodworth, T. G., Rordorf, C., Batard, Y., Wright, A. M., & Jung, T. (2008). The human anti-IL-1 $\beta$  monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 10(3).
- Andersen, S. B., Egelund, G. B., Jensen, A. V., Petersen, P. T., Rohde, G., & Ravn, P. (2016). Failure of CRP decline within three days of hospitalization is associated with poor prognosis of Community-acquired Pneumonia. *Infectious Diseases*, 49(4), 251–260.
- Andrijevic, I., Matijasevic, J., Andrijevic, L., Kovacevic T., & Zaric, B. (2014). Interleukin-6 and procalcitonin as biomarkers in mortality prediction of hospitalized patients with community acquired pneumonia. *Annals of Thoracic Medicine*, 9(3), 162-167.
- Anselmo, A., Riva, F., Gentile, S., Soldani, C., Barbagallo, M., Mazzon, C., Feruglio, F., Polentarutti, N., Somma, P., Carullo, P., Angelini, C., Bacci, M., Mendolicchio, G. L., Voza, A., Nebuloni M., Mantovani, A., & Garlanda, C. (2016). Expression and function of IL-1R8 (TIR8/SIGIRR), a regulatory member of the IL-1 receptor family in platelets. *Cardiovascular Research*, 111(4), 373-384.

- Antonangelo, L., & Capelozzi, V. L. (2006). Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, 32(Suppl 4), 163-169
- Antonelli, A., Ferri, C., Ferrari, S. M., Ghiri, E., Goglia, F., Pampana, A., Bruschi, F., & Fallahi, P. (2009). Serum levels of proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  in mixed cryoglobulinemia. *Arthritis & Rheumatism*, 60(12), 3841–3847.
- Antonelli, G., Bagnato, F., Pozzilli, C., Simeoni, E., Bastianelli, S., Currenti, M., De Pisa, F., Fieschi, C., Gasperini, C., Salvetti, M., & Dianzani, F. (1998). Development of Neutralizing Antibodies in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Treated with IFN- $\beta$ 1a. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 18(5), 345-350.
- Ata, S., Wattoo, F. H., Ahmed, M., Wattoo, M. H. S., Tirmizi, S. A., & Wadood, A. (2015). A method optimization study for atomic absorption spectrophotometric determination of total zinc in insulin using direct aspiration technique. *Alexandria Journal of Medicine*, 51(1), 19–23.
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., Ahmadian, M. R., Moll J. M., & Scheller, J. (2018). The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6-sIL-6R-sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 293(18), 6762-6775.
- Barcenas-Morales, G., Cortes-Acevedo, P., & Doffinger, R. (2019). Anticytokine autoantibodies leading to infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 32(4), 330–336.
- BD Biosciences (n.d.). BD FACSCanto™ II. Consultado a 10 de Outubro de 2019 em <https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facs canto-ii>.
- Bekeredjian-Ding, I., & Jegu, G. (2009). Toll-like receptors - sentries in the B-cell response. *Immunology*, 128(3), 311-323.
- Bendtzen, K., Hansen, M. B., Ross, C., & Svenson, M. (1998). High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunology Today*, 19(5), 209-211.
- Berg, R. E., & Forman, J. (2006). The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection. *Current Opinion in Immunology*, 18(3), 338-343.
- Bian, F., Wu, Y., and Zhang, C. (2017). Variation in the levels of IL-6 in pediatric patients with severe bacterial infectious diseases and correlation analysis between the levels of IL-6 and procalcitonin. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3484-3488.
- Boehmer, H., Kisielow, P., Kishi, H., Scott, B., Borgulya, P., & Teh, H. S. (1989). The Expression of CD4 and CD8 Accessory Molecules on Mature T Cells is not Random but Correlates with the Specificity of the alphabeta Receptor for Antigen. *Immunological Reviews*, 109(1), 143-152.
- Bonfield, T. L., Kavuru, M. S., & Thomassen, M. J. (2002). Anti-GM-CSF Titer Predicts Response to GM-CSF Therapy in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Clinical Immunology*, 105(3), 342–350.

- Bonneville, M., O'Brien, R. L., & Born, W. K. (2010).  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 467–478. doi:10.1038/nri2781
- Born, T. L., Smith, D. E., Garka, K. E., Renshaw, B. R., Bertles, J. S., & Sims, J. E. (2000). Identification and Characterization of Two Members of a Novel Class of the Interleukin-1 Receptor (IL-1R) Family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 29946-29954.
- Brogan, T. V., Hall, M., Williams, D. J., Neuman, M. I., Grijalva, C. G., Farris, R. W., & Shah, S. S. (2012). Variability in Processes of Care and Outcomes among Children Hospitalized with Community-Acquired Pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(10), 1036-1041.
- Browne, S. K., & Holland, S. M. (2010). Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: pathogenesis and mechanisms. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(12), 875–885. doi: 10.1016/s1473-3099(10)70196-1
- Browne, S. K., & Holland, S. M. (2010). Immunodeficiency secondary to anticytokine autoantibodies. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(6), 534-541.
- Burbelo, P. D., Browne, S. K., Sampaio, E. P., Giaccone, G., Zaman, R., Kristosturyan, E., Rajan, A., Ding, L., Ching, K. H., Berman, A., Oliveira, J. B., Hsu, A. P., Klimavicz, C. M., Iadarola, M. J., Holland, S. M. (2010). Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood*, 116(23), 4848-4858.
- Byington, C. L., Hulten, K. G., Ampofo, K., Sheng, X., Pavia, A. T., Blaschke, A. J., Pettigrew, M., Korgenski, K., Daly, J., & Mason, E. O. (2009). Molecular Epidemiology of Pediatric Pneumococcal Empyema from 2001 to 2007 in Utah. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 520-525.
- Byington, C. L., Spencer, L. Y., Johnson, T. A., Pavia, A. T., Allen, D., Mason, E. O., Kaplan, S., Carroll, K. C., Daly, J. A., Christenson, J. C., & Samore, M. H. (2002). An Epidemiological Investigation of a Sustained High Rate of Pediatric Parapneumonic Empyema: Risk Factors and Microbiological Associations. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 434-440.
- Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T., & Vilen, B. J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology*, 7(8), 633–643. doi:10.1038/nri2133
- Cappellano, G., Orilieri, E., Woldetsadik, A. D., Boggio, E., Soluri, M. F., Comi, C., Sblattero, D., Chiocchetti, A., & Dianzani, U. (2012). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *American journal of clinical and experimental immunology*, 1(2), 136–146.
- Cardoso, M. R. A., Nascimento-Carvalho, C. M. C., Ferrero, F., Berezin, E. N., Ruvinsky, R., Santanna, C. C., Brandileone, M. C., March, Mde., Maggi, R., Feris-Iglesias, J., Benguigui, Y., Camargos, P. A., and Camargos, P. A. M. (2014). Empyema and bacteremic pneumococcal pneumonia in children under five years of age. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, 40(1), 69–72.
- Castano, L., & Eisenbarth, G. S. (1990). Type-I Diabetes: A Chronic Autoimmune Disease of Human, Mouse, and Rat. *Annual Review of Immunology*, 8(1), 647–679.

- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 3-23.
- Charfi, A., Mahfoudh, N., Frikha, F., Kamoun, A., Dammak, C., Gaddour, L., Maalej, L., Mallek, B., Kammoun, I., Bahloul, Z., & Makni, H. (2019). Association of HLA Alleles with Primary Sjögren's Syndrome in the South Tunisian Population. *Medical Principles and Practice*.
- Chen, Q., Wang, W.-C., Bruce, R., Li, H., Schleider, D. M., Mulbury, M. J., Bain, M. D., Wallace, P. K., Baumann, H. & Evans, S. S. (2004). Central Role of IL-6 Receptor Signal-Transducing Chain gp130 in Activation of L-Selectin Adhesion by Fever-Range Thermal Stress. *Immunity*, 20(1), 59–70.
- Chen, Y.-L., Qiao, Y.-C., Pan, Y.-H., Xu, Y., Huang, Y.-C., Wang, Y.-H., Geng L.-J., Zhao H.-L., & Zhang, X.-X. (2017). Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*, 94, 14–20.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D. T., Ma, C. S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S. G., & Mackay, C. R. (2011). CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 186(10), 5556-5568.
- Clark, J. E., Hammal, D., Hampton, F., Spencer, D., & Parker, L. (2006). Epidemiology of community-acquired pneumonia in children seen in hospital. *Epidemiology and Infection*, 135(2), 262–269.
- Coelho, L. M., Salluh, J. I., Soares, M., Bozza, F. A., Verdeal, J. C. R., Castro-Faria-Neto, H. C., Silva, J. R. L., Bozza, P. T. & Póvoa, P. (2012). Patterns of c-reactive protein RATIO response in severe community-acquired pneumonia: a cohort study. *Critical Care*, 16(2). R53
- Cohen, M. C., & Cohen, S. (1996). Cytokine Function: A Study in Biologic Diversity. *American Journal of Clinical Pathology*, 105(5), 589-598.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I., Silosi, I., & Vrabie, C. (2011). Pulmonary Manifestations of Systemic Autoimmune Diseases. *Maedica (Buchar)*, 6(3), 224-229
- Conteduca, G., Indiveri, F., Filaci, G., & Negrini, S. (2018). Beyond APECED: An update on the role of the autoimmune regulator gene (AIRE) in physiology and disease. *Autoimmunity Reviews*, 17(4), 325-330.
- Corwin, E. J. (2000). Understanding Cytokines Part I: Physiology and Mechanism of Action. *Biological Research For Nursing*, 2(1), 30-40.
- Costenbader, K. H., Chang, S., Vivo, I. D., Plenge, R., & Karlson, E. W. (2008). Genetic polymorphisms in PTPN22, PADI-4, and CTLA-4 and risk for rheumatoid arthritis in two longitudinal cohort studies: Evidence of gene-environment interactions with heavy cigarette smoking. *Arthritis Research & Therapy*, 10(3). R52.
- Courtney, L. P., Phelps, J. L., & Karavodin, L. M. (1994). An anti-IL-2 antibody increases serum half-life and improves anti-tumor efficacy of human recombinant interleukin-2. *Immunopharmacology*, 28(3), 223-232.

- Cruz, G. I., Shao, X., Quach, H., Ho, K. A., Sterba, K., Noble, J. A., Patsopoulos, N. A., Busch, M. P., Triulzi, D. J., Wong, W. S., Solomon, B. D., Niederhuber, J. E., Criswell, L. A., & Barcellos, L. F. (2016). A Child's HLA-DRB1 genotype increases maternal risk of systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 74, 201–207.
- Culina, S., Brezar, V., & Mallone, R. (2013). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Insulin and type 1 diabetes: immune connections. *European Journal of Endocrinology*, 168(2), R19-31.
- Dayer, J. (2003). The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 42(2), 3ii-10ii.
- De Brito, R. de C. C. M., Lucena-Silva, N., Torres, L. C., Luna, C. F., Correia, J. de B., & da Silva, G. A. P. (2016). The balance between the serum levels of IL-6 and IL-10 cytokines discriminates mild and severe acute pneumonia. *BMC Pulmonary Medicine*, 16(1).
- Díaz-Conradi A., Hernández S., García-García J.J., Muñoz-Almagro C., Moraga-Llop F., Ciruela P., Izquierdo C., Campins, M., de Sevilla, M. F., González-Peris, S., Uriona, S., Martínez-Osorio, J., Solé-Ribalta, A., Codina, G., Esteva, C., Planes, A. M., Soldevila, N., Salleras, L. & Domínguez A. (2019) Complicated pneumococcal pneumonia with pleural effusion or empyema in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Pediatric Pulmonology*, 54(5):517-524.
- Dinareello, C. A. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *The FASEB Journal*, 8(15), 1314-1325.
- Döffinger, R., Helbert, M. R., Barcenas-Morales, G., Yang, K., Dupuis, S., Ceron-Gutierrez, L., Espitia-Pinzon, C., Barnes, N., Bothamley, G., Casanova, J. L., Longhurst, H. J., & Kumararatne, D. S. (2004). Autoantibodies to Interferon- $\gamma$  in a Patient with Selective Susceptibility to Mycobacterial Infection and Organ-Specific Autoimmunity. *Clinical Infectious Diseases*, 38(1). e10-e14
- Dumke, R., Schnee, C., Pletz, M. W., Rupp, J., Jacobs, E., Sachse, K., Rohde, G., & Group, C. S. (2015). *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia spp.* Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany, 2011–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(3), 426-434.
- Dunn-Walters, D. K. (2015). The ageing human B cell repertoire: A failure of selection?. *Clinical & Experimental Immunology*, 183(1), 50-56.
- Dursun, E., Gezen-Ak, D., Hanağası, H., Bilgiç, B., Lohmann, E., Ertan, S., Atasoy, İ. L., Alaylıoğlu, M., Araz, Ö. S., Önal, B., Gündüz, A., Apaydın, H., Kızıltan, G., Ulutin, T., Gürvit, H., & Yilmazer, S. (2015). The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset alzheimers disease, mild cognitive impairment or Parkinsons disease. *Journal of Neuroimmunology*, 283, 50-57.
- Elemraid, M. A., Thomas, M. F., Blain, A. P., Rushton, S. P., Spencer, D. A., Gennery, A. R., & Clark, J. E. (2014). Risk factors for the development of pleural empyema in children. *Pediatric Pulmonology*, 50(7), 721-726.



- Engel, A., Kern, W. V., Mürdter, G., & Kern, P. (1994). Kinetics and correlation with body temperature of circulating interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in patients with fever and neutropenia. *Infection*, 22(3), 160–164.
- Eskilsson, A., Mirrasekhian, E., Dufour, S., Schwaninger, M., Engblom, D., & Blomqvist, A. (2014). Immune-Induced Fever Is Mediated by IL-6 Receptors on Brain Endothelial Cells Coupled to STAT3-Dependent Induction of Brain Endothelial Prostaglandin Synthesis. *Journal of Neuroscience*, 34(48), 15957–15961.
- Eurodiab Ace Study Group (2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. (2000). *The Lancet*, 355(9207), 873–876.
- European Medicines Agency. (2011). Bioanalytical method validation. Retirado de <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>
- Finley, C., Clifton, J., Fitzgerald, J. M., & Yee, J. (2008). Empyema: An Increasing Concern in Canada. *Canadian Respiratory Journal*, 15(2), 85-89.
- Fischer, A., Antoniou, K. M., Brown, K. K., Cadranel, J., Corte, T. J., Bois, R. M. D., Lee, J. S., Leslie, K. O., Lynch, D. A., Matteson, E. L., Mosca, M., Noth, I., Richeldi, L., Strek M. A., Swigris, J. J., Wells, A. U., West S. G., Collard, H. R., & Cottin, V. (2015). An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. *European Respiratory Journal*, 46(4), 976–987.
- Gądek-Michalska, A., & Bugajski, J. (2010). Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Pharmacological Reports*, 62(6), 969-982.
- Galle, P., Svenson, M., Bendtzen, K., & Hansen, M. B. (2004). High levels of neutralizing IL-6 autoantibodies in 0.1% of apparently healthy blood donors. *European Journal of Immunology*, 34(11), 3267–3275.
- Garrido, V. V., Sancho, J. F., Blasco, H., Gafas, A. D., Rodríguez, E. P., Panadero, F. R., Candeira, S. R., Velázquez A. S., Valdés, L., & Cuadrado, L. V. (2006). Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. *Archivos De Bronconeumología ((English Edition))*, 42(7), 349-372.
- Gouda, W., Mageed, L., Dayem, S. M. A. E., Ashour, E., & Afify, M. (2018). Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in type 1 diabetes mellitus. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1). 1-6
- Grijalva, C., Nuorti, J., Zhu, Y., & Griffin, M. (2010). Increasing Incidence of Empyema Complicating Childhood Community-Acquired Pneumonia in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 805-813.
- Grisaru-Soen, G., Eisenstadt, M., Paret, G., Schwartz, D., Keller, N., Nagar, H., & Reif, S. (2013). Pediatric Parapneumonic Empyema. *Pediatric Emergency Care*, 29(4), 425–429.
- Hardie, W., Bokulic, R., Garcia, V. F., Reising, S. F., & Christie, C. D. (1996). Pneumococcal Pleural Empyemas in Children. *Clinical Infectious Diseases*, 22(6), 1057-1063.
- Haren, F. M., Foudraine, N., & Gillham, M. (2007). Cardiothoracic Critical Care. In D. Sidebotham, M. Gillham, A. Mckee & J. H. Levy (Eds). *Infection and Sepsis* (pp. 510-536).

- Hart, J. E., Laden, F., Puett, R. C., Costenbader, K. H., & Karlson, E. W. (2009). Exposure to Traffic Pollution and Increased Risk of Rheumatoid Arthritis. *Environmental Health Perspectives*, 117(7), 1065-1069.
- Hervé, M., Isnardi, I., Ng, Y., Bussel, J. B., Ochs, H. D., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2007). CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1583-1593.
- Hime, N. J., Zurynski, Y., Fitzgerald, D., Selvadurai, H., Phu, A., Deverell, M., Elliott E. J., & Jaffe, A. (2015). Childhood interstitial lung disease: A systematic review. *Pediatric Pulmonology*, 50(12), 1383–1392.
- Hundhausen, C., Roth, A., Whalen, E., Chen, J., Schneider, A., Long, S. A., Wei, S., Rawlings, R., Kinsman, M., Evanko, S. P., Wight, T. N., Greenbaum, C. J., Cerosaletti, K., Buckner, J. H. (2016). Enhanced T cell responses to IL-6 in type 1 diabetes are associated with early clinical disease and increased IL-6 receptor expression. *Science Translational Medicine*, 8(356), 1-11.
- Ingels, H., Schejbel, L., Lundstedt, A., Jensen, L., Laursen, I. A., Ryder, L. P., Heegaard, N. H., Konradsen, H., Christensen, J. J., Heilmann, C., & Marquart, H. V. (2015). Immunodeficiency Among Children with Recurrent Invasive Pneumococcal Disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(6), 644–651.
- Iorio, A. D. (2003). Serum IL-1 $\beta$  levels in health and disease: a population-based study. The InCHIANTI study. *Cytokine*, 22(6), 198–205.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343-353.
- Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., & Adamopoulos, I. E. (2016). The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*, 15(1), 1-8.
- Jog, N. R., Chakravarty, E. F., Guthridge, J. M., & James, J. A. (2018). Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Frontiers in Immunology*, 9(2198)
- Jones, S. A., Scheller, J., & Rose-John, S. (2011). Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3375-3383.
- Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F., & Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 160-167.
- Jouvenne, P., Fossiez, F., Garrone, P., Djossou, O., Banchereau, J., & Miossec, P. (1996). Increased incidence of neutralizing autoantibodies against interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in nondestructive chronic polyarthritis. *Journal of Clinical Immunology*, 16(5), 283-290.
- Kambayashi, T., & Laufer, T. M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: Can anything replace a dendritic cell? *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 719-730. doi:10.1038/nri3754
- Kärner, J., Pihlap, M., Ranki, A., Krohn, K., Podkrajsek, K. T., Bratanic, N., Battelino, T., Willcox, N., Pärt Peterson, P., & Kisand, K. (2016). IL-6-specific autoantibodies among APECED and thymoma patients. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(2), 235-243.

- Klein, J. O. (1981). The Epidemiology of Pneumococcal Disease in Infants and Children. *Clinical Infectious Diseases*, 3(2), 246–253.
- Kleiner, G., Marcuzzi, A., Zanin, V., Monasta, L., & Zauli, G. (2013). Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–6.
- Knight, V., Merkel, P., & O’Sullivan, M. (2016). Anticytokine Autoantibodies: Association with Infection and Immune Dysregulation. *Antibodies*, 5(1), 1-20.
- Koshy, E., Murray, J., Bottle, A., Sharland, M., & Saxena, S. (2010). Impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccination (PCV7) programme on childhood hospital admissions for bacterial pneumonia and empyema in England: National time-trends study, 1997-2008. *Thorax*, 65(9), 770-774.
- Krenke, K., Urbankowska, E., Urbankowski, T., Lange, J., & Kulus, M. (2016). Clinical characteristics of 323 children with parapneumonic pleural effusion and pleural empyema due to community acquired pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(5), 292–297.
- Kwak, B. O., Choung, J. T., & Park, Y. M. (2015). The Association between Asthma and Invasive Pneumococcal Disease: A Nationwide Study in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 30(1), 60-65.
- Lebien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580.
- Light, R. W. (2006). Parapneumonic Effusions and Empyema. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3 (1), 75-80.
- Lilisari, M., Nataprawira, H. M., & Gurnida, D. A. (2016). Serum interleukin-6 and mean platelet volume in pediatric pneumonia. *Paediatrica Indonesiana*, 56 (1), 57-61. doi:10.14238/pi56.1.2016.57-61
- Lin, S., Huang, Z., Wang, M., Weng, Z., Zeng, D., Zhang, Y., Zhu, Y., & Jiang, J. (2015). Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis. *Journal of Critical Care*, 30(4), 732-738. d
- Lindqvist, E., Eberhardt, K., Bendtzen, K., Heinegard, D., & Saxne, T. (2005). Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(2):196-201.
- Liu, X., Ye, F., Xiong, H., Hu, D., Limb, G. A., Xie, T., Peng, L., Zhang, P., Wei, Y., Zhang, W., Wang, J., Wu, H., Lee, P., Song, E., & Zhang, D. Y. (2015). IL-1 $\beta$  Induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 331(1), 223-231.
- Long, A. E., Gillespie, K. M., Rokni, S., Bingley, P. J., & Williams, A. J. (2012). Rising Incidence of Type 1 Diabetes Is Associated With Altered Immunophenotype at Diagnosis. *Diabetes*, 61(3), 683-686.
- Lu, B., Solomon, D. H., Costenbader, K. H., & Karlson, E. W. (2014). Alcohol Consumption and Risk of Incident Rheumatoid Arthritis in Women: A Prospective Study. *Arthritis & Rheumatology*, 66(8), 1998-2005.

- Mahlaoui, N., Gathmann, B., Kindle, G., Ehl, S., ESID registry working party steering committee & ESID society (2014). The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry: recent advancements in the epidemiology of primary Immunodeficiencies and how does that translate in clinical care. *International Journal of Public Health*. 1(4), 25-27
- Mahon, C., Walker, W., Drage, A., & Best, E. (2016). Incidence, aetiology and outcome of pleural empyema and parapneumonic effusion from 1998 to 2012 in a population of New Zealand children. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 52(6), 662-668.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., & Roitt, I. M. (2012). *Immunology, international edition* (8th ed.). United States: Elsevier/Saunders.
- Maniwa, K., Ogushi, F., Tani, K., Ohmoto, Y., Muraguchi, M., & Sone, S. (2000). Increased incidence of autoantibodies to interleukin-1  $\alpha$  in rheumatoid arthritis with interstitial lung disease. *Respirology*, 5(4), 315-320.
- Maskell, N. A., Batt, S., Hedley, E. L., Davies, C. W. H., Gillespie, S. H., & Davies, R. J. O. (2006). The Bacteriology of Pleural Infection by Genetic and Standard Methods & Its Mortality Significance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(7), 817–823.
- Mayo clinic. (n.d.). Tests & Procedures: Complete blood count. Consultado a 10 de Outubro de 2019 em <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/complete-blood-count/about/pac-20384919>
- Mcgeough, M. D., Pena, C. A., Mueller, J. L., Pociask, D. A., Broderick, L., Hoffman, H. M., & Brydges, S. D. (2012). Cutting Edge: IL-6 Is a Marker of Inflammation with No Direct Role in Inflammasome-Mediated Mouse Models. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2707–2711.
- Merkel, P. A., Lebo, T., & Knight, V. (2019). Functional Analysis of Anti-cytokine Autoantibodies Using Flow Cytometry. *Frontiers in Immunology*, 10 (1517), 1-9.
- Metzger, T. C., & Anderson, M. S. (2011). Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunological Reviews*, 241(1), 89-103.
- Meyer, S., Woodward, M., Hertel, C., Vlaicu, P., Haque, Y., Kärner, J., Macagno, A., Onuoha, S. C., Fishman, D., Peterson, H., Metsküla, K., Uibo, R., Jäntti, K., Hokynar, K., & Wolff, A. S. B. (2016). AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell*, 166(3), 582–595.
- Michelin, E., Snijders, D., Conte, S., Via, P. D., Tagliaferro, T., Dalt, L. D., Monciotti, C. M., Simioni, P., Stefanutti, G., Ghirardo, V., Gamba, P., & Barbato, A. (2008). Procoagulant activity in children with community acquired pneumonia, pleural effusion and empyema. *Pediatric Pulmonology*, 43(5), 472–475.
- Miller, F. W., Alfredsson, L., Costenbader, K. H., Kamen, D. L., Nelson, L. M., Norris, J. M., & Roos, A. J. D. (2012). Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *Journal of Autoimmunity*, 39(4), 259–271.

- Murphy, K. M., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L., Chaplin, D., Janeway, C. A., Travers, P., & Walport, M. (2017). *Janeways immunobiology*. New York: GS, Garland Science, Taylor & Francis Group
- Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., Takayasu, A., Ebisawa, M., Hosoya, T., Shirai, T., Sugihara, T., Hirata, S., Kubota, T., Harigai, M., & Miyasaka, N. (2013). Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(6), 1100-1102.
- Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2006). Interleukin 6: From bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(11), 619-626.
- Nomura, A., Gupta, V. K., Dauer, P., Sharma, N. S., Dudeja, V., Merchant, N., Ashok, S., & Banerjee, S. (2017). NFκB-Mediated Invasiveness in CD133 Pancreatic TICs Is Regulated by Autocrine and Paracrine Activation of IL-1 Signaling. *Molecular Cancer Research*, 16(1), 162-172.
- Norma nº 008/2015 de 1 de junho atualizada a 5 de Junho de 2015. Diário da República nº 105/2015- 2ª série, Direção Geral de Saúde. Lisboa.
- Ogushi, F., Tani, K., Endo, T., Tada, H., Kawano, T., Asano, T., Huang, L., Ohmoto, Y., Muraguchi, M., Moriguchi, H., & Sone, S. (2001). Autoantibodies to IL-1α in sera from rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Medical Investigation*, 48(3-4), 181-189.
- Ostapchuk, M., Roberts, D. M., & Haddy, R., (2004). Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children. *American Family Physician*, 70(5), 899-908.
- Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., & Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 76(1), 25-37.
- Patel, S. Y., Ding, L., Brown, M. R., Lantz, L., Gay, T., Cohen, S., Martyak, L. A., Kubak, B., & Holland, S. M. (2005). Anti-IFN-γ Autoantibodies in Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4769–4776.
- Pérol, L., Lindner, J. M., Caudana, P., Nunez, N. G., Baeyens, A., Valle, A., Sedlik, C., Loirat, D., Boyer, O., Créange, A., Cohen, J. L., Rogner, U. C., Yamanouchi, J., Marchant, M., Leber, X. C., Scharenberg, M., Gagnerault, M.-C., Mallone, R., Battaglia, M., Santamaria, P., Hartemann, A., Traggiai, E., & Piaggio, E. (2016). Loss of immune tolerance to IL-2 in type 1 diabetes. *Nature Communications*, 7(1), 1-10.
- Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959-971.
- Puel, A., Picard, C., Lorrot, M., Pons, C., Chrabieh, M., Lorenzo, L., Mamani-Matsuda, M., Jouanguy, E., Gendrel, D., & Casanova, J. (2007). Recurrent Staphylococcal Cellulitis and Subcutaneous Abscesses in a Child with Autoantibodies against IL-6. *The Journal of Immunology*, 180(1), 647-654.
- Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H. S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A. M., Khoury, S. J., Fuhlbrigge, R. C., Kuchroo, V. K., Clark, R. A., & Kupper, T. S. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9–producing T cells. *Nature medicine*, 18(8), 1248–1253.

- Rabinovitch, A., & Suarez-Pinzon, W. L. (2003). Role of Cytokines in the Pathogenesis of Autoimmune Diabetes Mellitus. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 4(3), 291–299.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476–483.
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M. R., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2011). IL-1 and IL-1 Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology*, 187(9), 4835–4843.
- Rojas, O.-L., Rojas-Villarraga, A., Cruz-Tapias, P., Sánchez, J. L., Suárez-Escudero, J.-C., Patarroyo, M.-A., & Anaya, J.-M. (2010). HLA class II polymorphism in Latin American patients with multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 9(6), 407–413.
- Rose-John, S. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: Role in inflammation and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(2), 227–236.
- Sahn, S. A. (2007). Diagnosis and Management of Parapneumonic Effusions and Empyema. *Clinical Infectious Diseases*, 45(11), 1480–1486.
- Scarpino, S., Napoli, A. D., Stoppacciaro, A., Antonelli, M., Pillozzi, E., Chiarle, R., Palestro, G., Marino, M., Facciolo, F., Rendina, E. A., Webster, K. E., Kinkel, S. A., Scott, H. S., & Ruco, L. (2007). Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clinical & Experimental Immunology*, 149(3), 504–512. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03442.x
- Schlenz, H., Intemann, T., Wolters, M., González-Gil, E. M., Nappo, A., Fraterman, A., Veidebaum, T., Molnar, D., Tornaritis, M., Sioen, I., Mårild, S., Iacoviello, L., & Ahrens, W. (2014). C-reactive protein reference percentiles among pre-adolescent children in Europe based on the IDEFICS study population. *International Journal of Obesity*, 38( Suppl 22). 26–31
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 41–52.
- Schweiger, D. S., Mendez, A., Jamnik, S. K., Bratanic, N., Bratina, N., Battelino, T., Brecelj, J., & Vidan-Jeras, B. (2016). High-risk genotypes HLA-DR3-DQ2/DR3-DQ2 and DR3-DQ2/DR4-DQ8 in co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease. *Autoimmunity*, 49(4), 240–247.
- Schwerd, T., Twigg, S. R., Aschenbrenner, D., Manrique, S., Miller, K. A., Taylor, I. B., Capitani, M., McGowan S. J., Sweeney, E., Weber, A., Chen, L., Bowness, P., Riordan, A., Cant, A., Freeman, A. F., Milner, J. D., Holland, S. M., Frede, N., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Grimbacher, B., Wall, S. A., Jones, E. Y., Wilkie A. O. M., & Uhlig, H. H. (2017). A biallelic mutation in IL-6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(9), 2547–2562.
- Senstad, A. C., Surén, P., Brauteset, L., Eriksson, J. R., Høiby, E. A., & Wathne, K.-O. (2008). Community-acquired pneumonia (CAP) in children in Oslo, Norway. *Acta Paediatrica*, 98(2), 332–336.
- Shah, S., & Sharieff, G. Q. (2007). Pediatric Respiratory Infections. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 25(4), 961–979.

- Shea, K., Lash, T., Antonsen, S., Jick, S., & Sørensen, H. T. (2015). Population-based study of the association between asthma and pneumococcal disease in children. *Clinical Epidemiology*, 7, 325-334.
- Sigaux, J., Semerano, L., Favre, G., Bessis, N., & Boissier, M. (2018). Salt, inflammatory joint disease, and autoimmunity. *Joint Bone Spine*, 85(4), 411-416.
- Sims, J. E., Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., & Shanebeck, K. (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6155-6159.
- Spohn, G., Arenas-Ramirez, N., Bouchaud, G., & Boyman, O. (2017). Endogenous polyclonal anti-IL-1 antibody responses potentiate IL-1 activity during pathogenic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(6), 1957-1965.
- Spriggs, M. K. (1996). ONE STEP AHEAD OF THE GAME: Viral Immunomodulatory Molecules. *Annual Review of Immunology*, 14(1), 101-130.
- Staal, F. J. T., Wiekmeijer, A.-S., Brugman, M. H., & Pike-Overzet, K. (2016). *The functional relationship between hematopoietic stem cells and developing T lymphocytes*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370 (1), 36–44.
- Stelmaszczyk-Emmel, A., Kopatys, A., Górka, E., Głodkowska-Mrówka, E., & Demkow, U. (2013). The usefulness of flow cytometric analysis of cytokines in peripheral blood and bone marrow plasma. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 879–886.
- Suzuki, H., Takemura, H., Yoshizaki, K., Koishihara, Y., Ohsugi Y., Okano, A., Akiyama, Y., Tojo, T., Kishimoto, T., & Kashiwagi, H. (1994). L-6-anti-IL-6 autoantibody complexes with IL-6 activity in sera from some patients with systemic sclerosis. *J. Immunol*, 152(2) 935-942.
- Svenson, M., Hansen, M. B., & Bendtzen, K. (1990). Distribution and Characterization of Autoantibodies to Interleukin 1 alpha in Normal Human Sera. *Scandinavian Journal of Immunology*, 32(6), 695-701.
- Szodoray, P., Szabó, Z., Kapitány, A., Gyetvai, Á., Lakos, G., Szántó, S., Szücs, G., & Szekanecz, Z. (2010). Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 9(3), 140–143.
- Takemura, H., Suzuki, H., Yoshizaki, K., Ogata, A., Yuhara, T., Akama, T., Yamane, k., and Kashiwagi, H. (1992). Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*, 35(8), 940–943.
- Talaat, I. M., Nasr, A., Alsulaimani, A. A., Alghamdi, H., Alswat, K. A., Almalki, D. M., Abushouk, A., Saleh, A. M., Allam, G. (2016). Association between type 1, type 2 cytokines, diabetic autoantibodies and 25-hydroxyvitamin D in children with type 1 diabetes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(12), 1425–1434.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10). 1-16.

- United Nations Childrens Fund (2016). Clear the air for children: The impact of air pollution on children. Consultado a 10 de Outubro de 2019 em [https://www.unicef.org/publications/files/UNICEF\\_Clear\\_the\\_Air\\_for\\_Children\\_30\\_Oct\\_2016.pdf](https://www.unicef.org/publications/files/UNICEF_Clear_the_Air_for_Children_30_Oct_2016.pdf)
- Viatte, S., Plant, D., Han, B., Fu, B., Yarwood, A., Thomson, W., Symmons, D. P. M., Worthington, J., Young, A., Hyrich, K. L., Morgan, A. W., Wilson, A. G., Isaacs, J. D., Raychaudhuri, S., & Barton, A. (2015). Association of HLA-DRB1 Haplotypes With Rheumatoid Arthritis Severity, Mortality, and Treatment Response. *Jama*, 313(16), 1645-1656.
- von Stemmann, J. H., Rigas, A. S., Thørner, L. W., Rasmussen, D. G., Pedersen, O. B., Rostgaard, K., Erikstrup, C., Ullum, H., & Hansen, M. B. (2017). Prevalence and correlation of cytokine-specific autoantibodies with epidemiological factors and C-reactive protein in 8,972 healthy individuals: Results from the Danish Blood Donor Study. *Plos One*, 12(6), 1-17.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snappe, C. M., Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*, 176(1), 154-170.
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., & Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor–interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 4(9), 920-927.
- Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., Kanazawa, H., Trapnell, B. C., Hoshino, Y., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Keicho, N., Goto, H., & Nakata, K. (2007). Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Letters*, 581(10), 2017-2021.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., & Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36(5), 1309–1323.
- World Health Organization (2016). Pneumonia. Consultado a 10 de Outubro de 2019 em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>.
- World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, *JAMA*, 310(20), 2191–2194.
- Xirouchaki, N., Tzanakis, N., Bouros, D., Kyriakou, D., Karkavitsas, N., Alexandrakis, M., & Siafakas, N. M. (2002). Diagnostic Value of Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor in Pleural Effusions. *Chest*, 121(3), 815-820.
- Zampoli, M., Kappos, A., Wolter, N., Gottberg, A. V., Verwey, C., Mamathuba, R., & Zar, H. J. (2015). Etiology and Incidence of Pleural Empyema in South African Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(12), 1305-1310.
- Zhang, J., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37.



- Zhang, X., Ing, S., Fraser, A., Chen, M., Khan, O., Zakem, J., Davis, W., & Quinet, R. (2013). Follicular Helper T Cells: New Insights Into Mechanisms of Autoimmune Diseases. *The Ochsner Journal*, 13(1), 131–139
- Zhou, J.-M., & Ye, Q. (2017). Utility of Assessing Cytokine Levels for the Differential Diagnosis of Pneumonia in a Pediatric Population\*. *Pediatric Critical Care Medicine*, 18(4), 162-166
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569.